

**Luís Felipe Neves dos Santos**

**AVALIAÇÃO DO REMODELAMENTO ATRIAL EM RATOS COM  
INSUFICIÊNCIA CARDÍACA INDUZIDA PELA ABLAÇÃO POR  
RADIOFREQUÊNCIA DO VENTRÍCULO ESQUERDO– UM NOVO  
MODELO EXPERIMENTAL DE FIBRILAÇÃO ATRIAL**

**Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola  
Paulista de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em  
Cardiologia, para obtenção do  
título de Doutor em Ciências.**

São Paulo

2019

**Luís Felipe Neves dos Santos**

**AVALIAÇÃO DO REMODELAMENTO ATRIAL EM RATOS COM  
INSUFICIÊNCIA CARDÍACA INDUZIDA PELA ABLAÇÃO POR  
RADIOFREQUÊNCIA DO VENTRÍCULO ESQUERDO– UM NOVO  
MODELO EXPERIMENTAL DE FIBRILAÇÃO ATRIAL**

**Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola  
Paulista de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em  
Cardiologia, para obtenção do  
título de Doutor em Ciências.**

**Orientador:**

**Prof. Dr. Guilherme Fenelon**

**Coorientador:**

**Prof. Dr. Paulo Tucci**

São Paulo

2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CARDIOLOGIA**

Chefe da Disciplina: Prof. Dr. Valdir Ambrósio Moises

Coordenador do programa de pós-graduação: Prof. Dr. Francisco  
Antonio Helfenstein Fonseca

**Luís Felipe Neves dos Santos**

**AVALIAÇÃO DO REMODELAMENTO ATRIAL EM RATOS COM  
INSUFICIÊNCIA CARDÍACA INDUZIDA PELA ABLAÇÃO POR  
RADIOFREQUÊNCIA DO VENTRÍCULO ESQUERDO– UM NOVO  
MODELO EXPERIMENTAL DE FIBRILAÇÃO ATRIAL**

**Presidente da banca:**

**Prof. Dr. Guilherme Fenelon**

**Banca examinadora:**

**Prof. Dr. Cláudio Cirenza**

**Dr. Elerson Arfelli**

**Dr. Jefferson Jaber**

**Dra. Lilian Caram Petrus**

**Suplentes:**

**Prof. Dr. Andrey Jorge Serra**

**Prof. Dr. José Antônio Silva Junior**

## DEDICATÓRIA

À Ciência.

## AGRADECIMENTOS

À “inteligência suprema, causa primária de todas as coisas”.

Ao avô Orlando Loures Neves, pelo exemplo vivo de que o trabalho árduo, contínuo e resignado é que alimenta a vida.

Gisele, pela parceria inquestionável, por acreditar nos meus sonhos e caminhar sempre comigo.

Meus pais, irmãos, cunhadas e sobrinhos, por permitirem que a distância física que escolhi ter para vir a São Paulo não se traduzir em distância real. Obrigado por tudo que por mim fizeram e fazem.

João, Lelê, Tite, Bia, Bela, Nalu, Mamá, Pedro e André, por mostrarem como a vida anda rápido e por isso devemos dirigi-la com responsabilidade e fé.

Ao meu orientador Guilherme Fenelon, deixo meu eterno agradecimento pela oportunidade de crescimento. Que eu um dia consiga fazer diferença na vida profissional de alguém na mesma proporção que fez na minha.

Minha família paulista Junqueira Ribeiro de Alvarenga, por terem feito a mudança para São Paulo ser mais leve e confortável.

Minha família Torres Amaral, por terem adotado um filho já barbado.

À família Aguiar Nascimento pela amizade verdadeira, tutoria em arritmia, alertas, broncas, paciência e amor. Thais, essa conquista é nossa.

Ao Professor Tucci, pelo espaço na família da fisiologia cardíaca e pelo exemplo de raciocínio crítico e metodológico.

Ao amigo Jairo Montemor por me guiar pelos primeiros passos na ecocardiografia.

Aos irmãos Ednei, Andrey, Flávio, Eduardo, Koiti e Lari além de essenciais para a conclusão deste trabalho, são amigos que a pesquisa me deu.

Aos amigos Carlos Balbão, Elerson Arfelli e Mieko Okada, por terem despertado em mim o encanto da pesquisa em eletrofisiologia.

À Unifesp-Escola Paulista de Medicina, por ter sido minha segunda casa por 9 anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2013 / 23725-0; 2013 / 23553-5 pelo suporte financeiro.

À Cummings Veterinary Medical Center - Tufts University, pela compreensão e concessão de tempo para que fosse possível finalizar a escrita desta tese.

Aos animais, fundamentais para esse trabalho, por sua contribuição à ciência.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Avaliação ecocardiográfica do átrio esquerdo.....	9
Figura 2: Traçado eletrocardiográfico e eletrograma intracavitário proximal.....	10
Figura 3: Indutibilidade de fibrilação atrial.....	15
Figura 4: Taxas de inducibilidade de fibrilação atrial .....	16
Figura 5: Histologia.....	17
Figura 6: Expressão de fator de transformação de crescimento beta 1 (TGF-1).....	18

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Compilação de principais artigos com métodos e resultados de modelos que induziram FA em roedores .....	24
---	----



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variáveis ecocardiográficas para os grupos ablação, ablação com espironolactona e sham 12 semanas após o procedimento de ablação.....	13
Tabela 2. Análise do comprimento do ciclo de fibrilação atrial (AFCL)* para ablação (Ab), ablação + espironolactona (AbSpi) e grupos sham.....	15

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ab	Ablação
AbSpi	Ablação com Espironolactona
AE	Átrio Esquerdo
AFCL	Comprimento do ciclo de FA (Atrial Fibrillation Cycle Length)
Ao	Aorta
ARM	Antagonista de Receptor de Mineralocorticóide
BPM	Batimentos Por Minuto
Cam	Câmaras
Cx	Conexina
DVED	Diâmetro Ventricular Esquerdo em Diástole
DVES	Diâmetro Ventricular Esquerdo em Sístole
FA	Fibrilação Atrial
FALD	Fibrilação Atrial de Longa Duração
FANS	Fibrilação Atrial Não Sustentada
FAS	Fibrilação Atrial Sustentada
ICa L	Canal de Cálcio Tipo L
ICC	Insuficiência Cardíaca Congestiva
IS	Ífero-Superior
ML	Médio-Lateral
NIFA	Não Induz Fibrilação Atrial
NS	Não Significativo
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
RF	Radiofrequência
RM	Receptor de mineralocorticóide
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Transformador Beta
VE	Ventrículo Esquerdo

## LISTA DE SÍMBOLOS

cm	Centímetro
Kg	Kilograma
Mg	Miligramma
MHz	Megahertz
mV	Milivolts
W	Watts

## RESUMO

**Objetivos:** Avaliar o remodelamento atrial e a vulnerabilidade da FA em um modelo de rato com ICC induzida por ablação por radiofrequência (RF) no ventrículo esquerdo (VE). **Métodos:** Ratos Wistar foram submetidos à toracotomia e divididos em 3 grupos: ICC induzido por RF (Ab, n = 36), animais ICC tratados com espironolactona (AbSpi, n = 20) e controles simulados (Sham, n = 29). Após 12 semanas, os animais foram submetidos a avaliação ecocardiográfica e eletrofisiológica e foram sacrificados para análise histológica (fibrose atrial) e western blotting (TGF- $\beta$ 1, colágeno I / III, Ca<sub>v</sub>1.2 e Connexin 43). **Resultados:** Disfunção leve do VE e aumento atrial acentuado foram observados em ambos os grupos ablacionados. A inducibilidade de FA (episódios  $\geq$  2 segundos) aumentou no grupo Ab em comparação aos animais Sham (31/36, 86%; vs. 15/29, 52%; p = 0,005), mas não diferiu do grupo AbSpi (16 / 20, 80%, p = NS). A FA sustentada (> 30 segundos) também foi mais frequente no grupo Ab em relação aos Sham (56% vs. 28%; p = 0,04). A espironolactona reduziu a fibrose atrial (p <0,01), bem como a expressão de TGF- $\beta$ 1 (p <0,01) e Colágeno I / III (p <0,001), mas não afetou a expressão de cálcio (Ca<sub>v</sub>1.2 ) e Conexina 43. **Conclusão:** Ratos com ICC induzida por RF exibem pronunciado remodelamento estrutural atrial e aumento da vulnerabilidade à FA. Este modelo pode ser útil para estudar o substrato da FA na ICC.

## ABSTRACT

**Aims:** To evaluate atrial remodeling and AF vulnerability in a rat model of CHF induced by left ventricle (LV) radiofrequency (RF) ablation. **Methods:** Wistar rats had thoracotomy performed and divided into 3 groups: RF-induced CHF (Ab, n=36), CHF animals treated with spironolactone (AbSpi, n=20) and sham controls (Sham, n=29). After 12 weeks, animals underwent echocardiographic and electrophysiological evaluation and were sacrificed for histological (atrial fibrosis) and western blotting (TGF- $\beta$ 1, Collagen I/III, Ca<sub>v</sub>1.2 and Connexin 43) analysis. **Results:** Mild LV dysfunction and marked atrial enlargement were noted in both ablated groups. AF inducibility (episodes  $\geq$  2 seconds) increased in the Ab group compared to sham animals (31/36, 86%; vs. 15/29, 52%; p=0.005), but did not differ from the AbSpi group (16/20, 80%; p=NS). Sustained AF (> 30 seconds) was also more frequent in the Ab group compared to shams (56% vs. 28%; p=0.04). Spironolactone reduced atrial fibrosis (p <0.01) as well as TGF-  $\beta$ 1 (p <0.01) and Collagen I/III (p <0.001) expression but did not affect calcium (Ca<sub>v</sub>1.2) nor Connexin 43 expression. **Conclusion:** Rats with RF-induced CHF exhibit pronounced atrial structural remodeling and enhanced AF vulnerability. This model may be useful for studying AF substrate in CHF.

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA .....	v
AGRADECIMENTOS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE QUADROS .....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xi
RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 OBJETIVOS .....	7
3 MÉTODOS.....	8
3.1 Cirurgia e protocolo de ablação .....	8
3.2 Subdivisão dos animais .....	8
3.3 Ecodopplercardiografia (ECHO).....	9
3.4 Inducibilidade da arritmia .....	9
3.5 Análise da refratariedade atrial .....	10
3.6 Histologia.....	11
3.7 Western blotting .....	11
3.8 Análise estatística.....	12
4 RESULTADOS .....	13
4.1 Ablação por radiofrequência.....	13
4.2 Ecodopplercardiografia .....	13
4.3 Estudo eletrofisiológico.....	14
4.4 Histologia.....	16
4.5 Western Blotting .....	17
5 DISCUSSÃO .....	19
5.1 Limitações .....	23
6 CONCLUSÕES.....	25
7 REFERÊNCIAS .....	26
Anexo	
Apêndices	

## 1 INTRODUÇÃO

A fibrilação atrial (FA) é a arritmia sustentada mais comum, afetando aproximadamente 2% da população geral (Chugh S et al., 2014). Frequentemente coexiste com insuficiência cardíaca congestiva (ICC), uma vez que a ICC promove FA e a FA piora a ICC, sendo que a presença simultânea de ambas aumenta substancialmente o risco de eventos cardiovasculares e morte (Stambler, Laurita, 2008). As relações temporais entre FA e ICC foram examinadas em 1470 pacientes (The Framingham Heart Study) com FA ou ICC de início recente (Wang TJ et al., 2003). Entre os pacientes que desenvolveram FA, 26% teve diagnóstico prévio ou concomitante de ICC e 16% dos pacientes restantes subsequentemente desenvolveram ICC durante o período de acompanhamento. Entre os pacientes que desenvolveram ICC, 24% tinham diagnóstico prévio ou concomitante de FA e 17% AF desenvolveu FA durante o seguimento. Esses dados demonstram o grande impacto na associação entre ICC e FA.

A susceptibilidade à FA em pacientes com ICC tem sido atribuída a uma variedade de alterações estruturais e eletrofisiológicas nos átrios, particularmente dilatação e fibrose intersticial atriais (Natel et al., 2008). De acordo com o triângulo de arritmogênese de Coumel, três pilares são requeridos no início da arritmia clínica: o substrato arritmogênico, o fator de gatilho e os fatores de modulação (Farré J, Wellens HJ, 2004). A interação entre esses fatores determina o quadro clínico e estabelecimento da arritmia. Neste sentido, na ausência de substrato importante para a persistência da FA, os episódios de FA geralmente são autolimitados, caracterizando a FA paroxística. Por outro lado, em átrios extensivamente remodelados, a FA persiste até sua cardioversão (FA persistente) ou mesmo indefinidamente (FA permanente).

Fibrose tecidual ocorre quando fatores pro-fibróticos circulantes ou locais atuam em células cardíacas aumentando a produção de colágeno de forma desregulada. A ICC aumenta a expressão de mediadores de fibrose como o fator de crescimento transformador (TGF- $\beta$ 1), que desempenha um papel significativo na gênese da fibrose atrial (Everett, Olgin, 2007). O TGF- $\beta$ 1 é central para a sinalização das cascatas implicadas na gênese da fibrose cardíaca, uma vez que atua primariamente na estimulação da produção de colágeno, controle de crescimento, proliferação e

apoptose celular (Nattel et al., 2008). Em situações de dilatação de câmaras, o estiramento tecidual induz maior expressão de TGF-  $\beta$ 1 por miofibroblastos e, dessa forma, a dilatação atrial crônica contribui para o remodelamento estrutural e para o favorecimento de arritmias como a FA (Everett, Olgin, 2007). O remodelamento atrial de pacientes com disfunção grave do ventrículo esquerdo (VE) e FA persistente de longa duração foram comparados com pacientes em ritmo sinusal e com função VE normal. A expressão de marcadores prófibróticos foi maior nos pacientes em ICC e FA com elevados índices indicativos de remodelamento estrutural atrial (Molina et al., 2018).

Além disso, um aspecto de grande interesse na fisiopatologia da FA tem sido avaliação das gap-junctions atriais. As gap-junctions contêm proteínas de canal iônico transmembrana chamadas conexinas (Cx), que promovem continuidade elétrica mantendo baixa resistência de condução intercelular. Assim como as alterações da conexina são importantes como substrato arritmogênico nos ventrículos, recentemente a avaliação de Cx e seu papel no remodelamento elétrico atrial tem recebido maior atenção (Burstein et al., 2009; Molina et al., 2018). A ICC está associada a diminuição da expressão das Cx40 e 43 - maiores proteínas das gap-junctions atriais (Burstein et al., 2009) e, conseqüentemente, retardo de condução intra-atrial (Jennings et al., 2013), mas resultados em estudo com pacientes e animais são ainda conflitantes (Molina et al., 2018). Compreender o comportamento das Cx atriais pode ser importante para elucidar a organização da condução atrial e seus distúrbios, uma vez que anormalidades na expressão e localização das Cx são comumente observadas tanto em pacientes e experimentalmente em animais com FA (Burstein et al., 2009; Jennings et al., 2013). Dessa forma, fibrose atrial e desarranjo estrutural das gap junctions são anormalidades que, em conjunto, promovem alentecimento da condução local atrial favorecendo reentradas sustentadas. Pouco se sabe, no entanto, sobre as alterações da conexina durante remodelamento atrial relacionado às diversas causas de ICC e seu papel na manutenção da FA.

Além de alterações estruturais, distúrbios iônicos têm se tornado um elo essencial na relação entre FA e ICC, uma vez que a ICC desregula o ciclo de cálcio favorecendo a perpetuação da FA (Bond et al., 2017). Anormalidades no ciclo de cálcio podem ser pró-arrítmicas, levando a pós-potenciais precoces, pós-despolarizações tardias, e atividade deflagrada (Opacic et al., 2016). Vários fatores parecem aumentar a probabilidade de arritmias, incluindo desregulação da homeostase cálcio. Um dos



efeitos do remodelamento atrial induzido pela ICC está associado com alteração na expressão de canais de cálcio tipo L (ICa L), que pode alterar a configuração do potencial de ação e refratariedade atrial reduzindo o potencial de ação e, assim, encurtando o período refratário celular (Bond et al., 2017).

Estudos experimentais têm demonstrado redução de ICa L atriais em vigência de ICC (Ouadid et al., 1995; Li et al., 2000; Boixel et al., 2001; Cha et al., 2004a,b; Sridhar et al., 2009; Clarke et al., 2015), apesar de que esses achados não têm sido replicados em estudos com pacientes humanos. Interessantemente, essa redução de ICa L tem sido relacionada com aumento da suscetibilidade à FA (Le Grand et al., 1994; Deroubaix et al., 2004; Dinanian et al., 2008). A redução de ICa L pode ser secundária a diferentes fatores. Já se documentou que há diminuição na densidade de túbulos-T atriais em ICC e também alteração na expressão de canais de cálcio tipo L (Dibb et al., 2009; Lenaerts et al., 2009). Demonstrou-se que túbulos-T estão desorganizados em átrios dilatados (Brandenburg et al., 2016) e severamente reduzidos ou inexistentes em ICC (Dibb et al., 2009; Yeh et al., 2008). Em geral, muitas referências documentaram a diminuição de ICa L em ICC (Ouadid et al., 1995; Li et al., 2000; Boixel et al., 2001; Cha et al., 2004a,b,b; Dinanian et al., 2008; Sridhar et al., 2009; Clarke et al., 2015) que influencia a disponibilidade de cálcio no retículo sarcoplasmático (Trafford et al., 2001; Clarke et al., 2015, 2017). Outro aspecto da vulnerabilidade do substrato atrial à persistência de FA é o influxo de cálcio na célula através de canais ICa-L durante breves períodos de estimulação atrial rápida. Quando os átrios são expostos a frequências rápidas, seja por indução de *bursts* ou por *triggers* espontâneos de veias pulmonares, existe um influxo de cálcio na célula (Yeh et al., 2008). O aumento de cálcio no retículo sarcoplasmático altera a curva do potencial de ação atrial, gerando aumento na frequência de pós-potenciais tardios. Esse mecanismo tem sido descrito principalmente em vigência de ICC (Yeh et al., 2008; Hohendanner et al., 2015, 2016; Aistrup et al., 2017). Este acréscimo súbito no influxo de cálcio aumenta a probabilidade de indução de mais pós-potenciais, favorecendo arritmias sustentadas e perpetuando o ciclo anormal de cálcio intracelular (Bond et al., 2017). Dessa forma, a combinação de um tecido atrial com substrato (fibrose), com alteração de comunicação intercelular (anormalidades nas gap-junctions) e alterações iônicas (induzidas pela ICC) em associação com ritmo cardíaco anormal, favorece a formação de um ciclo arritmico vicioso e persistente.

A formação de fibrose cardíaca pode também ser iniciada pela ligação de aldosterona ao receptor de mineralocorticoide (RM). Os efeitos nocivos da aldosterona no sistema cardiovascular também incluem apoptose dos miócitos, estresse oxidativo do miocárdio e remodelamento elétrico, lesão vascular, disfunção endotelial e indução de arritmias (Lammers et al., 2012). Em uso clínico, antagonistas de RM (ARM) mostraram benefícios clínicos em pacientes com insuficiência cardíaca. Os estudos RALES (Randomized Aldactone Evaluation Study), EPHESUS e EMPHASIS – HF (Eplerenone in Mild Patients Hospitalization and Survival Study in Heart Failure) demonstraram que os ARMs reduziram taxas de morte em geral, morte por doença cardiovascular, hospitalização em geral e também hospitalização por ICC (Pitt et al. 1999; Pitt et al., 2003; Zannad et al., 2011). Um dos resultados benéficos do estudo RALES foi associado à supressão do marcador de síntese de colágeno cardíaco pelo ARM espironolactona (Zannad et al., 2000). Com intuito de prevenir os efeitos deletérios do remodelamento estrutural, agentes anti-fibróticos foram explorados e mostraram reduzir a fibrose atrial e a vulnerabilidade à FA em modelos experimentais de ICC (Lee et al., 2006; Le Grand et al., 2014) e assim também parecem reduzir a incidência de FA em ensaios clínicos (Chaugai et al., 2016). Foi demonstrado em modelos animais que ARMs, como a espironolactona e a eplerenona, atenuam a fibrose atrial induzida pela ICC e também reduzem taquiarritmias atriais (Stambler, Laurita, 2008; Lammers et al., 2012; Tanaka-Esposito et al., 2014). A espironolactona também melhorou a condução atrial em pacientes com ICC reduzindo remodelamento atrial, favorecendo a propagação de impulso elétrico e reduzindo o potencial de fragmentação elétrica, minimizando mecanismos de reentrada (Tanaka-Esposito et al., 2013). Em outro estudo, efeitos da aldosterona e seus receptores foram observados no tecido atrial. Embora não tenha havido diferença no nível de aldosterona atrial, os pacientes com FA tiveram aumento da expressão de RM em comparação com pacientes em ritmo sinusal e a aldosterona induziu remodelamento iônico atrial e evidente sobrecarga de cálcio (Tsai et al., 2010). Especificamente, a aldosterona aumentou a corrente de cálcio do tipo-T, diminuiu a corrente de potássio retificadora lenta (iKs) mas não teve efeito sobre a corrente de cálcio do tipo-L. Essas alterações foram atenuadas pela espironolactona. Esses resultados sugerem que a aldosterona pode desempenhar um papel no remodelamento elétrico e estrutural, podendo também ter papel como fator causativo da FA. Curiosamente, nível sérico de

aldosterona esteve elevado em pacientes com FA secundária a diferentes causas, que foi reduzido 48h após cardioversão para ritmo sinusal (Goette et al., 2001).

O modelo de infarto do miocárdio induzido por ligadura da artéria coronária esquerda em ratos tem sido validado para simular ICC humana e também remodelamento atrial esquerdo (Pfeffer et al., 1979). Entretanto, esse modelo apresenta desvantagens como mortalidade imediata significativamente elevada e alta variabilidade do tamanho do infarto do miocárdio (Opitz et al., 1995; Pfeffer et al., 1985). Como alternativa à oclusão coronariana, demonstramos recentemente um método de indução de infarto do miocárdio por ablação por radiofrequência (RF) no ventrículo esquerdo de ratos, que está associado a infarto com tamanhos homogêneos e baixa mortalidade (Antonio et al., 2009). O calor liberado na ablação por RF em uma área limitada condiciona o tamanho da lesão, que é proporcional ao tamanho do eletrodo utilizado e à temperatura na interface eletrodo-tecido, que, por sua vez, depende da energia liberada pela ablação e do tempo de exposição. Estas variáveis podem ser controladas facilmente durante o procedimento experimental, para que o tamanho da lesão permaneça homogêneo entre os animais. O reduzido número de complicações desencadeada pela ablação por RF, bem como a possibilidade de controlar o tamanho da lesão miocárdica, nos motivou a dar seguimento ao método em outras linhas de pesquisa (Dos Santos et al., 2012; Dos Santos et al., 2013). Demonstramos homogênea dilatação das cavidades ventriculares e moderada disfunção sistólica dos ratos submetidos à lesão ventricular por RF assim como relação aumentada entre átrio esquerdo e aorta (AE/Ao) nos animais submetidos à técnica de ablação, mostrando repercussão hemodinâmica e remodelamento estrutural importantes nos átrios esquerdos (Dos Santos et al., 2012). Além disso, a evolução histopatológica, gravidade de disfunção ventricular esquerda e desfecho da ICC reproduziram achados similares aos observados em oclusão coronariana (Antonio et al., 2009). No entanto, alterações estruturais atriais e suscetibilidade para FA não foram avaliadas nestes estudos.

Dada a importância do estudo eletrofisiológico para o homem, o desenvolvimento de técnicas para ratos é de evidente valor clínico e experimental. Autores desenvolveram um método de eletrofisiologia endocárdica *in vivo* para avaliar refratariedade e propriedades de condução atriais e ventriculares em ratos (Wakili et al., 2011). Além disso, o modelo forneceu um método para avaliar as mudanças na eletrofisiologia cardíaca em ratos no cenário de doenças iônicas geneticamente

programadas, no entanto essas alterações não foram avaliadas em vigência de ICC. Uma importante investigação em pequenos roedores que superexpressavam TGF- $\beta$ 1 demonstrou alterações de automatismo, refratariedade e condução atriais suficientes para produzir o substrato para a FA em camundongos (Verheule et al., 2004). Além deste, outros trabalhos investigaram fibrose atrial e conexinas em ratos com ICC induzida por ligadura da artéria coronária e por sobrecarga de pressão, mas não se avaliou o comportamento eletrofisiológico desses átrios em vigência de ICC, o que é mais próximo da realidade clínica (Milliez et al., 2005; Everett & Olgin, 2007).

Nossa hipótese é que nosso modelo de ICC induzida pela ablação por RF do VE promove dilatação atrial esquerda e fibrose intersticial suficientes para aumentar a vulnerabilidade à FA. Portanto, nós avaliamos remodelamento estrutural atrial e indução de FA em ratos com ICC induzida por ablação por RF. Adicionalmente, avaliamos o impacto da espironolactona na fibrose atrial e na induzibilidade da FA, por ser reconhecidamente efetiva na prevenção de fibrose miocárdica.

## **2 OBJETIVOS**

Avaliar o remodelamento estrutural atrial e a indução de FA em ratos com ICC induzida por ablação por RF. Além disso, avaliar o impacto da espironolactona na fibrose atrial e na inducibilidade da FA.

### **3 MÉTODOS**

#### **3.1 Cirurgia e protocolo de ablação**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (número de protocolo: 8052201213). Um total de 85 ratos Wistar machos (300 - 320g) foram submetidos à toracotomia no 4º espaço intercostal para exposição do coração. Após anestesiados com associação de ketamina e xylazina (Ketamina 80-100 mg/kg e Xylazina 5-10 mg/kg I.P.) e monitorizados continuamente por pelo menos um veterinário, os animais foram submetidos à ablação. Realizou-se uma ablação por animal, na parede livre do ventrículo esquerdo com parâmetros fixos em 12W de potência por 12 segundos de aplicação de acordo como previamente publicado (Antonio et al., 2009; Dos Santos et al., 2012; Dos Santos et al., 2013). Em seguida, o coração foi rapidamente reposicionado dentro do tórax e o mesmo fechado com sutura simples. Após a recuperação, os animais foram mantidos por 12 semanas em gaiolas condicionadas e em ciclo de luz de 12 / 12h.

#### **3.2 Subdivisão dos animais**

Três grupos foram avaliados: (1) toracotomia sem ablação (SHAM, n=35); (2) ICC induzida por ablação por RF (grupo Ab, n=43); (3) e animais ablacionados e tratados com espironolactona (grupo AbSpi, n=28). O tratamento com espironolactona foi realizado na dose de 100mg/kg *per os*, por gavagem, uma vez ao dia por 12 semanas. Durante seguimento de 12 semanas, os animais foram mantidos em gaiolas condicionadas e em ciclo de luz de 12h. No final do período de acompanhamento (12 semanas), os ratos foram anestesiados para ecodopplercardiografia e estudo eletrofisiológico. Em seguida, os animais foram sacrificados e os corações submetidos a avaliação histológica e Western Blotting do átrio esquerdo.

### 3.3 Ecodopplercardiografia (ECHO)

Após 12 semanas da cirurgia, os animais foram analisados utilizando ecocardiógrafo HP SONOS 5500 (Philips Medical System, Andover, MA) com transdutor de 12 MHz, profundidade de 2 cm. Além da análise da função ventricular esquerda (Kanashiro et al., 2006), assim como diâmetro do átrio esquerdo, a área e a relação átrio esquerdo / aorta também foram avaliadas (Figura 1).

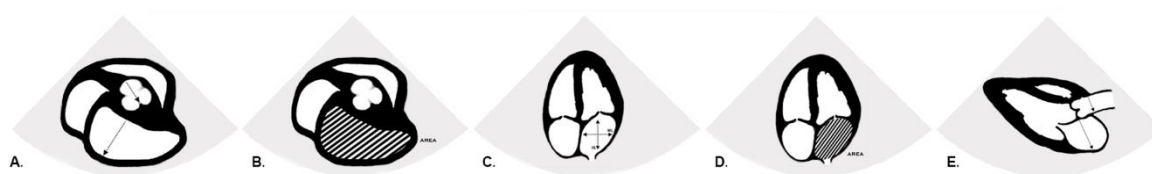


Figura 1. Avaliação ecocardiográfica do átrio esquerdo. A) Relação átrio esquerdo / aorta pelo modo bidimensional com corte transverso da base; B) área atrial esquerda no corte transverso da base; C) Avaliação dos segmentos ínfero-superior e médio-lateral do átrio esquerdo ao corte longitudinal apical 4 câmaras; D) Área atrial esquerda no corte longitudinal apical 4 câmaras; Método de análise da relação átrio esquerdo / aorta pelo corte longitudinal cranial paraesternal esquerdo.

### 3.4 Inducibilidade da arritmia

O estudo eletrofisiológico percutâneo foi realizado utilizando um cateter octapolar (cateter EPR 1.6F, AD instruments) posicionado no átrio direito através da veia jugular direita. ECG de superfície e eletrogramas intracardíacos bipolares (3 canais) filtrados em 30-500 Hz, foram visualizados em um monitor e armazenados por um sistema de registro computadorizado (PowerLab®, Austrália). A função do nó sinusal e os intervalos de condução atrioventricular não foram avaliados. A inducibilidade da arritmia foi realizada com estimulações em bursts a 20 e 40 ms por até 30 segundos (iniciando em curtos bursts de 2s e aumentando progressivamente para 4, 10, 15 até 30s de duração), usando as intensidades de corrente de 1200 a 1500mV (estimulador STG3008, MultiChannels - Reutlingen, Alemanha).

A FA foi definida como eletrograma intracavitário atrial irregular (> 800 bpm) com resposta ventricular irregular e com duração superior a 2 segundos. Os episódios de FA foram categorizados da seguinte forma: a) Sem indução de FA (episódios menores que 2 segundos); b) AF não sustentada ( $\geq$  2 segundos); c) AF sustentada (> 30 segundos); d) AF sustentada de longa duração (> 15 minutos; 900s). A duração da

FA foi medida a partir do final do burst até a primeira onda P do ritmo sinusal pós-FA e foi determinada em cada rato como a duração média de todos os episódios de FA.

### 3.5 Análise da refratariedade atrial

Devido à baixa estabilidade do cateter, não foi possível avaliar com segurança os períodos refratários do átrio direito por meio de testes de extra-estímulos. Portanto, utilizamos o comprimento do ciclo de FA (AFCL - *atrial fibrillation cycle length*) registrado nos eletrodos intracavitários como uma estimativa da refratariedade atrial (Fenelon et al., 2002; Yuen et al., 2015). A análise do AFCL consistiu em medir manualmente, usando paquímetro eletrônico (observador cego), os intervalos de atividade elétrica atrial (média de 10 a 20 ciclos) durante o 31º segundo episódio de FA de animais com FA sustentada. Escolhemos esse período para permitir a acomodação da refratariedade atrial (Figura 2). A média, mediana e intervalos mais curtos de ciclos de FA foram avaliados. Traçados de eletrogramas fracionados com multicomponentes ou com artefatos de movimento foram excluídos.

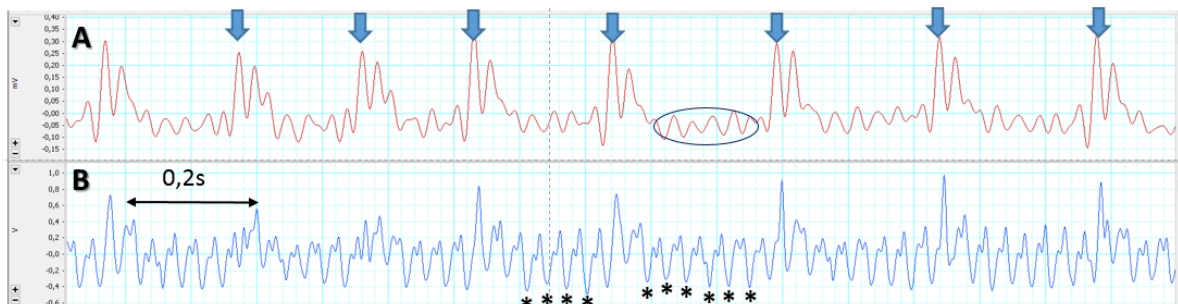


Figura 2 – Traçado eletrocardiográfico e eletrograma intracavitário proximal. A) Traçado eletrocardiográfico de animal com fibrilação atrial (FA; 266bpm); Setas indicam complexos QRS – vide ritmo irregular, ausência de ondas P e presença de ondas f (oscilação de linha de base, sem ondas definidas - trecho em elipse); B) Eletrograma intracavitário proximal (cateter octapolar 1,6F (EPR, Millar Instruments, Houston, TX). Espículas atriais (asteriscos) demonstram ondas da atividade elétrica da fibrilação atrial. O intervalo entre cada uma das ondas corresponde ao Atrial Fibrillation Cycle Length (AFCL). Seta (  $\longleftrightarrow$  ) corresponde a 0,2 segundos. O método de análise da AFCL consistiu em mensurar manualmente (operador cego aos grupos) os intervalos de espículas atriais no 31º segundo.



### 3.6 Histologia

A fibrose atrial foi quantificada com coloração com *Picrosirius red* (Milliez et al., 2005). A análise quantitativa de colágeno (avaliada em pixels) foi realizada após imagens sequenciais (10 campos por átrio) ao longo das fibras atriais e mensuradas cegamente por um avaliador Image Tool®.

### 3.7 Western blotting

Para determinar a expressão protéica de TGF- $\beta$ 1, colágeno I / III, conexina 43, e canal de cálcio do tipo-L (Cav1.2), os átrios esquerdos foram homogeneizados com tampão de lise RIPA frio (RIPA, Milipore, EUA), contendo fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF, 1 mM), ortovanadato de sódio (10 mM) coquetel inibidor de protease (2  $\mu$ L / mL, Sigma, EUA), fluoreto de sódio (100 mM) e pirofosfato de sódio (10 mM). Os homogeneizados foram subsequentemente centrifugados (1.500 g por 20 min a 4°C) e os sobrenadantes foram isolados. Quantidades iguais de proteínas (30  $\mu$ g) das amostras, o marcador de peso molecular (Precision Plus Protein, Kaleidoscope, Bio-Rad, EUA) e controles positivos (homogenatos de fibroblastos e encéfalo de camundongos (30  $\mu$ g) como controle positivo para colágeno I / III e conexina 43, respectivamente) foram eletroforéticamente separados em gel de poliacrilamida gradiente (4-20%, Bio-Rad, EUA) em um aparelho para minigel (Mini Protean III, Bio-Rad, EUA) e transferidos para membranas de PVDF (Amersham-GE Healthcare, Reino Unido) durante a noite a 4°C usando um sistema Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad, EUA). Após o bloqueio, as membranas foram incubadas durante a noite a 4°C com solução bloqueadora contendo os seguintes anticorpos: anti-colágeno I / III (1: 500; Calbiochen, EUA), anti-TGF-beta1 (1: 1000; Santa Cruz, EUA) ou anti-conexina 43 (1: 5000, Abcam, EUA). Após marcação com anticorpo primário, as membranas foram incubadas por 90 minutos com solução de bloqueio contendo anticorpo secundário apropriado conjugado com peroxidase (anti-coelho (Jackson Immuno Research, EUA): 1: 10.000 para colágeno I / III ou 1: 4.000 para TGF - beta1 e Conexina 43). Após a lavagem, os reagentes de detecção do kit de fluorescência (ECL, Amersham-GE Healthcare, UK) foram adicionados e a quimioluminescência da membrana foi detectada utilizando Amersham Imager 600 (Amersham-GE Healthcare, UK). A

análise densitométrica óptica das bandas foi realizada pelo programa Image J (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA). O controle de carregamento foi validado pela coloração da membrana com Ponceau S e os valores dos dados brutos densitométricos da coloração de Ponceau S foram semelhantes entre os grupos.

### **3.8 Análise estatística**

Os dados foram analisados com o programa estatístico Prism 4.0 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, EUA). O teste de Fisher foi usado para comparar a inducibilidade da FA. A duração da FA foi expressa como mediana e intervalo interquartil (25% a 75%) e foi analisada com teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. A normalidade dos dados foi examinada com o teste de Shapiro-Wilk. One-way ANOVA foi aplicado para comparar as variáveis contínuas entre os grupos, seguido por testes de Tukey. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão e o nível de significância foi estabelecido em  $p \leq 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Ablação por radiofrequência

O procedimento de ablação transcorreu sem intercorrências em todos os animais, sem complicações agudas. No entanto, durante o seguimento, a taxa de mortalidade foi de 16% ( $n = 7/43$ ) no grupo Ab, 28% ( $n = 8/28$ ) no grupo AbSpi e 17% ( $n = 6/35$ ) no grupo grupo sham ( $p = \text{NS}$ ). Todas as mortes ocorreram durante as primeiras 3 semanas após a ablação e foram relacionadas a insuficiência cardíaca grave ou complicações pós-operatórias. No grupo sham, metade das mortes foi causada por infecção pulmonar inesperada (estes 3 ratos foram alojados na mesma gaiola). Estes animais foram excluídos da análise.

### 4.2 Ecodopplercardiografia

Vinte e nove animais no grupo sham, 36 no grupo Ab e 20 no grupo AbSpi foram avaliados por ecodopplercardiografia. Alterações de contração segmentar na parede antero-lateral, indicativas de lesão de RF, foram observadas em todos os animais ablacionados. Nos grupos Ab e AbSpi, respectivamente, houve dilatação do ventrículo esquerdo (diâmetro diastólico de  $0,93 \pm 0,10$  cm vs.  $0,95 \pm 0,06$  cm;  $p = \text{NS}$ ) e leve redução da fração de ejeção do VE ( $57 \pm 11\%$  vs.  $52 \pm 7\%$ ;  $p = \text{NS}$ ). No entanto, o grau de dilatação do átrio esquerdo foi maior no grupo AbSpi ( $0,69 \pm 0,09$  cm vs.  $0,75 \pm 0,06$  cm;  $p = 0,02$ ). No grupo sham, o diâmetro do átrio esquerdo ( $0,62 \pm 0,08$  cm), as dimensões do ventrículo esquerdo (diâmetro diastólico  $0,73 \pm 0,10$  cm) e a fração de ejeção ( $83 \pm 9\%$ ;  $p < 0,001$ ) foram normais e significativamente diferentes ( $p < 0,001$ ) dos grupos ablacionados (Tabela 1).

**Tabela 1: Variáveis ecocardiográficas para os grupos ablação, ablação com espironolactona e sham 12 semanas após o procedimento de ablação.**

Variável	SHAM (n=29)	Ab (n=35)	AbSpi (n=20)
<b>Peso (g)</b>	422,5 ± 50,89	435,4 ± 49,55	430,1 ± 34,46
<b>AE (modo M)</b>	0,62 ± 0,08	0,69 ± 0,09**	0,75 ± 0,06 ***¥
<b>ML (cm) – 4cam</b>	0,53 ± 0,05	0,59 ± 0,09*	0,61 ± 0,08**
<b>IS – 4cam</b>	0,61 ± 0,07	0,69 ± 0,08***	0,73 ± 0,06***
<b>Área AE 4 cam</b>	0,28 ± 0,05	0,36 ± 0,08***	0,38 ± 0,07***
<b>Área AE (modo Bi)</b>	0,42 ± 0,07	0,55 ± 0,13***	0,59 ± 0,19***
<b>Relação AE/Ao (modo Bi)</b>	1,29 ± 0,18	1,62 ± 0,26***	1,7 ± 0,22***
<b>DVED</b>	0,73 ± 0,10	0,93 ± 0,10***	0,95 ± 0,06***
<b>DVES</b>	0,37 ± 0,17	0,68 ± 0,09***	0,72 ± 0,06***
<b>Fração de ejeção</b>	83 ± 8,9	57 ± 11***	52 ± 7,2***

Dados descritos como média ± desvio padrão. Sham: grupo simulado; Ab: grupo de ablação; AbSpi: ablação tratada com grupo espironolactona; AE: átrio esquerdo; ML: átrio esquerdo médio-lateral medido na visão de quatro câmaras; IS: átrio esquerdo infero-superior medido na visão de quatro câmaras; AE / Ao: Relação átrio esquerdo / aorta medida pelo eixo curto; DVED: diâmetro do ventrículo esquerdo na diástole; DVES: diâmetro do ventrículo esquerdo na sístole; \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001 versus SHAM; ¥ p = 0,02 versus Ab.

### 4.3 Estudo eletrofisiológico

Vinte e nove animais no grupo sham, 36 no grupo Ab e 20 no grupo AbSpi foram submetidos à avaliação eletrofisiológica. Como mostrado na figura 3 (painel A e B), a inducibilidade da FA (episódios ≥2s de duração) foi significativamente maior no grupo Ab em comparação aos animais sham (31/36, 86%; vs. 15/29, 52% respectivamente; p = 0,005), mas não diferiram do grupo AbSpi (16/20, 80%; p = NS). A FA tendeu a ser mais facilmente induzida no grupo AbSpi do que nos animais sham (80% vs. 52%; p = 0,07). A FA sustentada (> 30s de duração) também foi induzida mais freqüentemente no grupo Ab em relação aos animais sham (20/36, 55%; vs. 8/29, 28%; p = 0,04), sem diferença em relação ao AbSpi grupo (7/20; 35%; p = NS). A inducibilidade da FA sustentada não variou entre os grupos AbSpi e sham (35% vs. 28%; p = NS).

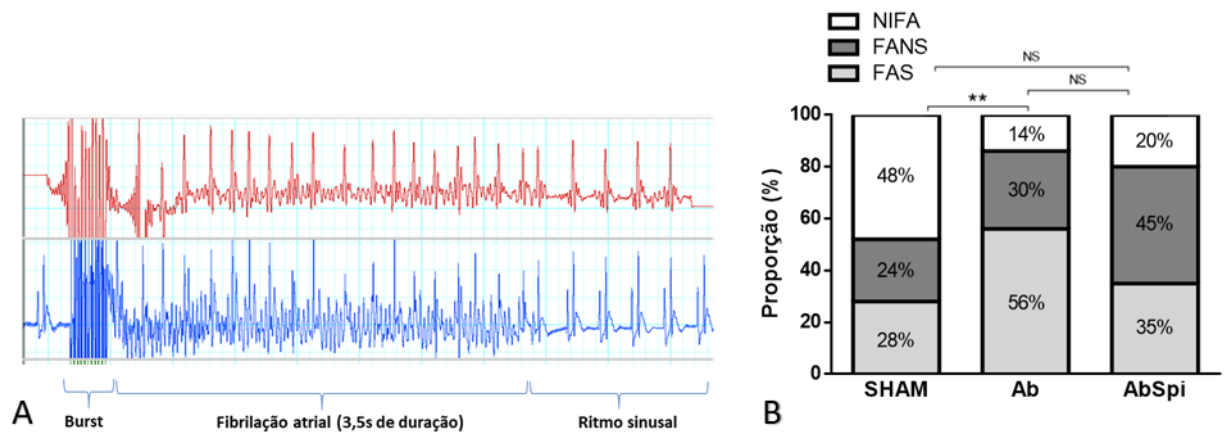


Figura 3. Indutibilidade de fibrilação atrial. (A) Indução de fibrilação atrial (FA) (duração de 3,5 segundos) por estimulação em sequência de 30 milissegundos por 0,3 segundos. (B) taxas de indutibilidade AF para ablação (Ab), ablação + espironolactona (AbSpi) e grupos sham. NIFA: FA não indutível; FANS: FA não sustentada; FAS: FA sustentada; \*\*  $p = 0,005$  versus placebo; NS: não significativo. FA tendeu a ser mais facilmente induzida no grupo AbSpi do que nos animais sham ( $p = 0,07$ ).

Além disso, como ilustrado na Figura 4 (A) episódios de FA de longa duração (> 15 min) ocorreram com mais frequência no grupo Ab do que nos animais sham (12/36, 33% vs. 1/29, 3%;  $p = 0,004$ ), mas sem diferença em comparação com Grupo AbSpi (5/20, 25%;  $p = \text{NS}$ ). FA de longa duração também foi mais comumente induzida no grupo AbSpi do que nos animais sham (25% vs. 3%;  $p = 0,03$ ).

A duração da FA induzida não foi estatisticamente diferente entre os 3 grupos de estudo ( $p = 0,07$ ), embora tenha havido uma tendência para o aumento da duração da FA no grupo Ab em comparação com os grupos sham e AbSpi. A duração da FA também foi aumentada no grupo Ab em comparação com ratos sham, mas essa diferença não alcançou significância estatística. No entanto, a duração da FA no grupo AbSpi foi comparável à dos animais sham (B).

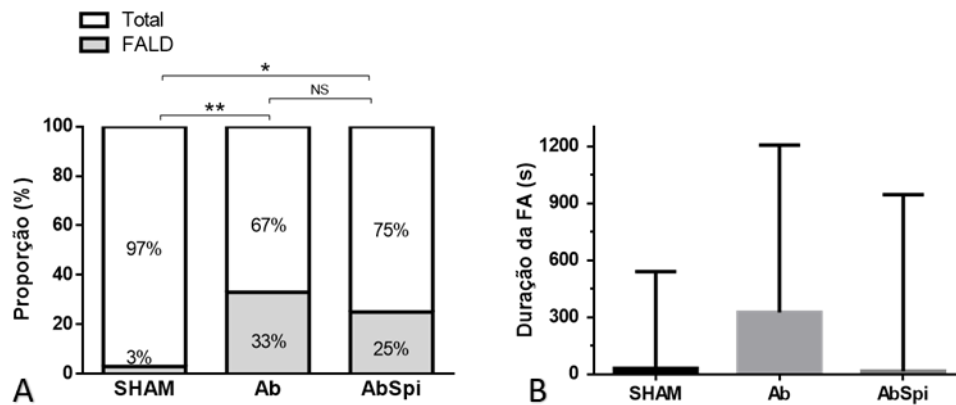


Figura 4 – Taxas de inducibilidade de fibrilação atrial. A) Taxas de inducibilidade de fibrilação atrial de longa duração (> 15 minutos) (FALD) dos grupos ablação (Ab), ablação + espironolactona (AbSpi) e grupos sham. \*\* p = 0,004 vs. sham; \* p = 0,03 vs. NS: não significativo. B) Duração da fibrilação atrial (FA). Dados descritos como mediana e intervalo interquartil. A duração da FA tendeu a ser maior no grupo Ab em comparação com os grupos sham e AbSpi (p = 0,07).

A AFCL pôde ser avaliada em 7 animais (24%) do grupo sham, 16 (44%) do grupo Ab e 6 (30%) do grupo AbSpi. Embora a média registrada, a mediana e a AFCL mais curta tenham sido maiores no grupo Ab do que nos animais sham, essas diferenças não foram significativas (tabela 2).

**Tabela 2. Análise do comprimento do ciclo de fibrilação atrial (AFCL)\* para ablação (Ab), ablação + espironolactona (AbSpi) e grupos sham.**

Grupo	AFCL média (ms)	AFCL mediana (ms)	Menor AFCL (ms)
Sham (n=7)	30 ± 4	30 ± 8	29 ± 4
Ab (n=16)	36 ± 13	36 ± 12	32 ± 12
AbSpi (n= 6)	31 ± 3	31 ± 3	28 ± 3,5
P =	NS	NS	NS

\* Intervalos medidos durante o 31º segundo do episódio de fibrilação atrial (FA) de animais com FA sustentada. Os dados são relatados como média ± desvio padrão. NS: não significativo; ms: milissegundo. Ver o texto para detalhes.

#### 4.4 Histologia

Seis animais no grupo sham, 5 no grupo Ab e 4 no grupo AbSpi foram submetidos à avaliação histológica. A fibrose intersticial do átrio esquerdo foi aumentada no grupo Ab em comparação aos animais sham (p <0,001) e AbSpi (p <0,01). No entanto, não foram observadas diferenças na quantidade de fibrose entre os ratos AbSpi e sham (Figura 5).

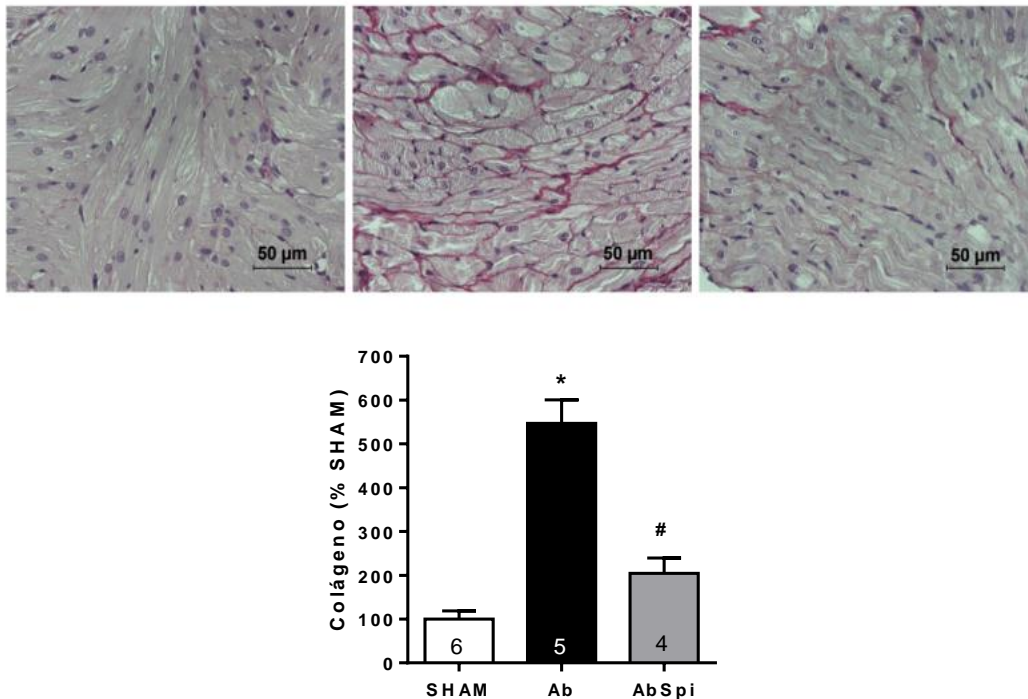


Figura 5: Histologia. Coloração de Picrosirius do átrio esquerdo de 1 animal em cada grupo (topo) e comparação da porcentagem de densidade de colágeno no átrio esquerdo (parte inferior). A fibrose intersticial foi aumentada no grupo ablação (Ab) em comparação com os animais sham (\* p < 0,001) e ablação + espironolactona (AbSpi) (# p < 0,01). A quantidade de fibrose não diferiu entre os ratos AbSpi e sham. Números dentro das barras indicam tamanhos de amostra.

#### 4.5 Western Blotting

Quatro animais em cada grupo foram utilizados para análise de expressão de TGF- $\beta$ 1, Colágeno I / III e Cav1.2. A expressão de TGF- $\beta$ 1 foi significativamente maior nos átrios esquerdos do grupo Ab em comparação aos animais sham e AbSpi (p < 0,01), e o colágeno I / III também aumentou significativamente no grupo Ab em comparação aos animais sham e tratados (p < 0,001). O tratamento com espironolactona (grupo AbSpi) reduziu significativamente a expressão da proteína TGF- $\beta$ 1 e colágeno I / III no átrio esquerdo para valores comparáveis àqueles observados em animais sham. Nos animais ablacionados (Ab e AbSpi), a expressão de Cav1.2 foi significativamente reduzida comparada a animais sham (p < 0,01). A expressão de Conexina 43 foi avaliada em 5 animais de cada grupo. Nos átrios esquerdos de ambos os grupos ablacionados (Ab e AbSpi), a expressão de Conexina

43 foi significativamente diminuída em comparação com animais sham ( $p < 0,01$ ) e a expressão de Conexina 43 não diferiu entre os animais Ab e AbSpi (Figura 6).

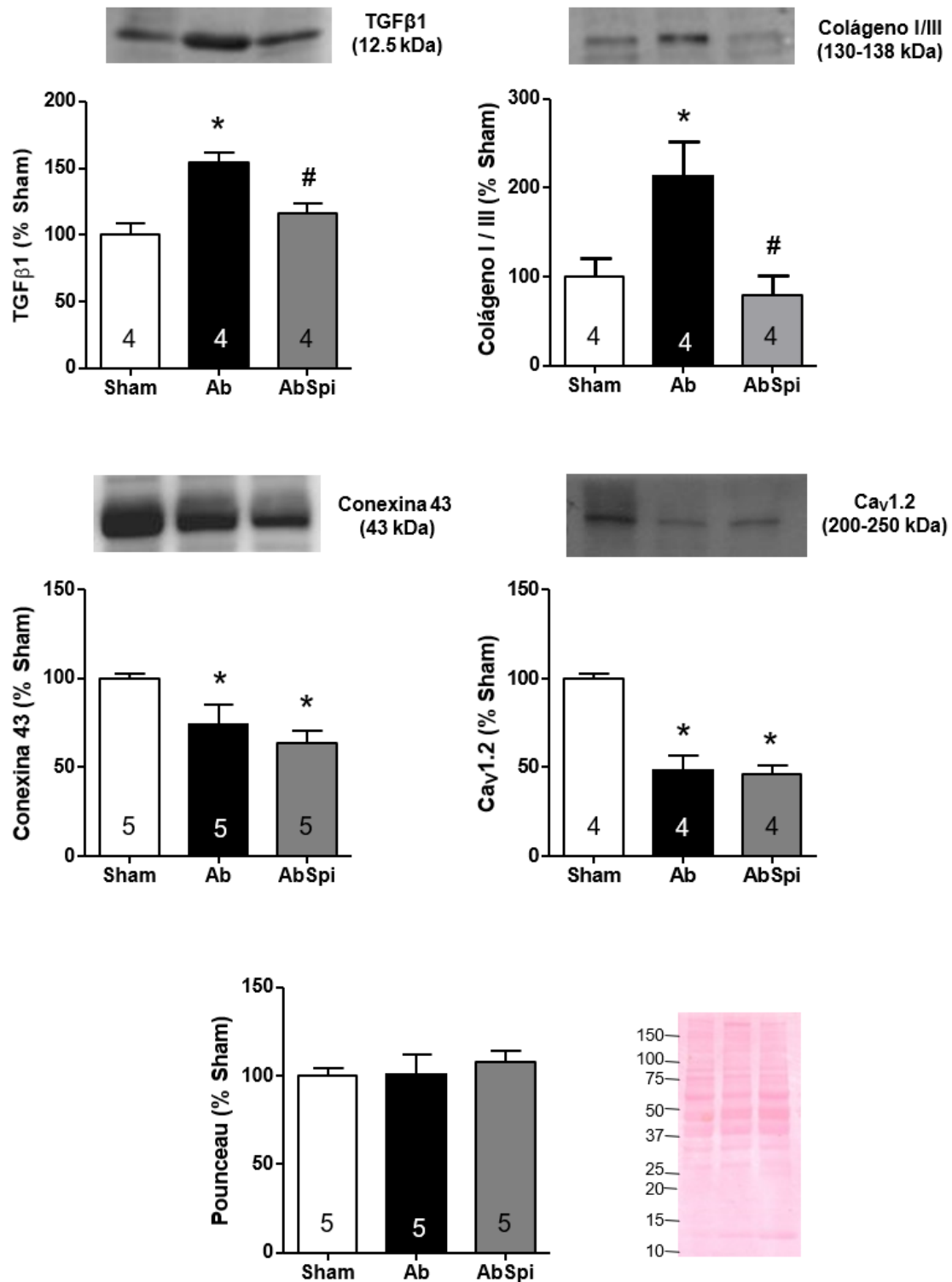


Figura 6: Expressão em cardiomiócitos atriais esquerdos de: fator de transformação de crescimento beta 1 (TGFβ-1); colágeno I / III; conexina 43; CaV1.2 e coloração por Ponceau utilizados como controle para ablação (Ab), ablação + espironolactona (AbSpi) e grupo sham. \*  $p < 0,01$  vs. sham; #  $p < 0,01$  vs. sham e AbSpi. Números dentro das barras indicam tamanhos de amostra.



## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo é o primeiro a avaliar o remodelamento atrial e a arritmogênese da FA em nosso modelo recentemente desenvolvido de insuficiência cardíaca induzido pela ablação por RF do ventrículo esquerdo em ratos (Antonio et al., 2009; Dos Santos et al., 2012; Dos Santos et al., 2013). Nós demonstramos que ratos com insuficiência cardíaca induzida por RF exibem alterações estruturais atriais acentuadas (dilatação e fibrose intersticial) e maior vulnerabilidade da FA em comparação com os animais do grupo sham. Além disso, assim como demonstrado em outros modelos de insuficiência cardíaca, o tratamento com o bloqueador do receptor mineralocorticóide espironolactona atenuou a fibrose atrial e a duração dos episódios de FA (Everett, Olgin, 2007; Milliez et al., 2005; Zhao et al., 2010) mas não alterou remodelamento elétrico.

Nosso modelo de insuficiência cardíaca foi desenvolvido como uma alternativa ao modelo de infarto do miocárdio de ratos induzido por ligadura da artéria coronária esquerda, que tem sido validado para simular a insuficiência cardíaca congestiva humana e remodelação atrial esquerda (Pfeffer et al., 1979; Opitz et al., 1995; Pfeffer et al., 1985). No entanto, o modelo de oclusão coronariana é limitado por sua elevada mortalidade imediata (em até 24 horas), que varia entre 13% e 65%, e alta variabilidade do tamanho do infarto do miocárdio do ventrículo esquerdo ( $40 \pm 19\%$ ) (Opitz et al., 1995; Pfeffer et al., 1985). Por outro lado, em nosso modelo de ablação por RF, a mortalidade imediata (24 horas; 7,5%) e o tamanho do infarto do miocárdio ( $45 \pm 8\%$ ;  $p = 0,001$ ) são consistentemente menores em comparação com animais submetidos à oclusão coronariana (Antonio et al., 2009; Dos Santos et al., 2012; Dos Santos et al., 2013). Corroborando a baixa mortalidade do nosso modelo no presente estudo, a taxa de mortalidade durante as primeiras 3 semanas de acompanhamento não diferiu entre os animais ablacionados (Ab 16%, AbSpi 28%) e controles simulados (17%;  $p = \text{NS}$ ).

Em nosso modelo de insuficiência cardíaca induzido por ablação por RF, o tamanho do infarto e o grau de disfunção miocárdica e dilatação atrial são altamente reprodutíveis. Essas características derivam dos mecanismos de formação de lesões por RF, que são mediadas termicamente e podem ser controladas ajustando-se a distribuição de energia, o tempo de aplicação e o tamanho do eletrodo (Antonio et al., 2009; Dos Santos et al., 2012; Wittkamp, Nakagawa, 2006). No presente estudo, os

ratos ablacionados desenvolveram consistentemente remodelamento atrial caracterizado por dilatação e fibrose intersticial do átrio esquerdo (Tabela 1, figura 4) e insuficiência cardíaca caracterizada como leve. Esta classificação foi definida em um estudo onde ratos em ICC induzida por oclusão coronariana foram divididos em grupos (ICC leve e severa) de acordo com graus de disfunção ventricular esquerda (fração de encurtamento ICC Leve  $27 \pm 3 \%$  vs.  $17 \pm 6 \%$  ICC Severa), dilatação atrial (ICC Leve  $7,1 \pm 0,2\text{mm}$  vs.  $0,97 \pm 0,1\text{mm}$  ICC Severa) e marcadores de fibrose atrial (Boixel et al., 2003). Nossos dados ecocardiográficos (tabela 1) e histológicos são compatíveis com os descritos neste estudo.

Além disso, demonstramos que a expressão da proteína fibrogênica TGF- $\beta$ 1 e Colágeno I/III foi marcadamente aumentada no grupo de ablação, enquanto a proteína de gap junction, Conexina 43, e canal de cálcio do tipo L (Cav1.2) foram significativamente diminuídos nos animais ablacionados (Figura 6).

É bem reconhecido em modelos animais de insuficiência cardíaca que essas anormalidades estruturais aumentam a vulnerabilidade à FA (Stambler, Laurita, 2008; Nattel et al., 2008; Everett, Olgin, 2007; Nishida et al., 2010). Assim, a inducibilidade da FA (episódios  $\geq 2$  segundos de duração) foi consistentemente aumentada (Figura 3) no grupo ablação em comparação com os animais sham (86% vs 52%;  $p = 0,005$ ). Além disso, os episódios de FA sustentada ( $> 30$  segundos de duração) e de longa duração ( $> 15$  minutos) foram mais frequentemente observados no grupo ablação do que nos animais sham (Figuras 3 e 4). Digno de nota, nossa taxa de inducibilidade de FA (86%) é comparável a ratos submetidos à oclusão coronariana (73%) (Zhang et al., 2014; Nishida et al., 2010).

Foi demonstrado em estudos experimentais que os bloqueadores dos receptores de mineralocorticoides atenuam a fibrose atrial induzida pela insuficiência cardíaca e a inducibilidade da FA (Everett, Olgin, 2007; Milliez et al., 2005; Zhao et al., 2010; Nishida et al., 2010). No presente estudo, a espironolactona foi escolhida por ser o antagonista da aldosterona mais utilizado na prática clínica. A espironolactona reduziu significativamente a fibrose intersticial atrial, bem como o TGF- $\beta$ 1 e a expressão do colágeno I / III, mas não afetou a expressão de Conexina 43 e canal de cálcio do tipo-L (Cav1.2) (Figuras 5 e 6), sugerindo que mudanças no remodelamento elétrico representado pela redução da expressão de Cav1.2 e conexina-43 permaneceram inalteradas pelo tratamento com espironolactona. Essas observações sugerem ainda que nosso modelo de ablação por RF exibe características de

remodelamento atrial comparáveis às da insuficiência cardíaca induzida por oclusão coronariana (Milliez et al., 2005; Zhao et al., 2010; Nishida et al., 2010). O tamanho do átrio esquerdo foi significativamente maior no grupo espironolactona comparado ao grupo ablação (Tabela 1). As razões para esse achado não são claras, mas podem estar relacionadas aos efeitos do fármaco no remodelamento ventricular e atrial. Em outro estudo, o tratamento com espironolactona piorou dilatação atrial e ventricular além de elevar a pressão diastólica em ratos submetidos a estenose aórtica (Okoshi et al., 2016). Em teoria, certo grau de fibrose é necessário para manter rigidez tecidual e prevenir dilatação de câmaras especialmente em casos de indução de lesão miocárdica aguda, como em nosso modelo. O átrio esquerdo dilatado é provavelmente derivado de disfunção ventricular esquerda e sobrecarga atrial hemodinâmica (Milliez et al., 2005), mas infelizmente estudo hemodinâmico para avaliar a pressão atrial não foi realizado em nosso estudo. Não é possível determinar se os resultados seriam diferentes caso outros fármacos antifibróticos, como o eplerenone ou pirfenidona fossem utilizados.

Embora a espironolactona tenha reduzido significativamente o remodelamento estrutural (menos fibrose atrial), o grupo AbSpi exibiu quase a mesma indutibilidade de FA que o grupo Ab. Essa observação intrigante pode ser associada a alterações persistentes nas propriedades eletrofisiológicas do átrio (remodelamento elétrico) (Nattel et al., 2008). Expressão de Cav1.2 e conexina 43 permaneceu significativamente diminuída nos animais tratados com espironolactona. Fluxo de cálcio pelo canal do tipo-L é regulado negativamente (*downregulation*) em vigência de ICC, alterando o potencial de ação e refratariedade de células atriais (Nattel et al., 2008). Além disso, certa desregulação do fluxo de cálcio foi relatado em modelos experimentais de insuficiência cardíaca (Yeh et al., 2008, Lugenbiel et al., 2015) e em ratos espontaneamente hipertensos (Plateneau et al., 2015) e contribuem para a desenvolvimento de atividade ectópica atrial. Dessa forma, é bem reconhecido que a FA pode ser iniciada e mantida por disparo focal rápido (Nattel et al., 2008, Nishida et al., 2010), que em nosso estudo foi documentada pela estimulação em bursts. Finalmente, o remodelamento das junção gap pode promover a alentecimento da condução atrial favorecendo reentrada sustentada (Nattel et al., 2008; Burstein et al., 2009; Jennings et al., 2013). Tem sido consistentemente relatado em modelos experimentais (Burstein et al., 2009; Jennings et al., 2013), incluindo um modelo de

FA de suíno com estimulação rápida e ICC (Igarashi et al., 2012), que alterações na expressão da conexina 43 estão associadas com FA.

A susceptibilidade aumentada à FA na insuficiência cardíaca está relacionada, principalmente, a anormalidades de condução nos átrios secundários à fibrose intersticial (Stambler, Laurita, 2008; Nattel et al., 2008; Everett, Olgin, 2007). Embora o remodelamento estrutural atrial pôde ser claramente demonstrado em nosso modelo, não foi possível determinar os mecanismos eletrofisiológicos subjacentes ao aumento da vulnerabilidade à FA. Devido à baixa estabilidade do cateter, os períodos refratários atriais não foram avaliados pelo teste de extra-estímulos. Como resultado, utilizamos o AFCL registrado nos eletrodos intracavitários como uma estimativa da refratariedade atrial (Fenelon et al, 2002; Yuen et al., 2015). Os intervalos de AFCL foram mais longos no grupo ablação do que nos animais SHAM, mas essa diferença não alcançou significância (Tabela 2). Além disso, a velocidade de condução interatrial não foi avaliada. A fibrose atrial contribui para transformar o miocárdio atrial em um tecido descontínuo, eletricamente instável e mais suscetível para reentradas múltiplas, fatores críticos para a gênese da FA. Seria interessante conduzir estudos de mapeamento óptico para tratar dessas questões (Iwasaki et al., 2014). No entanto, a vulnerabilidade à indução de FA pôde ser consistentemente demonstrada usando um protocolo de estimulação com estimulação em bursts de até 30 segundos. Esse protocolo agressivo de estimulação poderia superestimar a inducibilidade da FA, mas não afetaria a sustentabilidade da arritmia. Além disso, a definição de FA em nosso estudo exigiu um valor arbitrário de duração de pelo menos 2 segundos, enquanto na maioria dos estudos (quadro 1) o tempo de corte de duração varia de 0,5 a 1,0 segundo (Zhang et al., 2014; Nishida et al., 2010; Iwasaki et al., 2014). Sabe-se que a inducibilidade de FA depende do tamanho do átrio, quanto maior mais fácil é sua indução. A elevada inducibilidade de FA em nosso modelo reforça dados de literatura apontando que os átrios são comprometidos pela ICC, com alentecimento da condução e redução do comprimento de onda, favorecendo a formação de circuitos reentrantes. O fato de utilizarmos animais com átrios diminutos (ratos) ao invés de grandes animais (cães, caprinos) deve ser considerado ao analisar os critérios de duração da FA. Nesse aspecto, 2 segundos de sustentação é significativo para ratos, mas não para grandes animais e humanos. Finalmente, os intervalos de condução atrioventricular não foram registrados, no entanto essas variáveis não afetam a indutibilidade da FA.

**Quadro 1. Compilação de principais artigos com métodos e resultados de modelos que induziram FA em roedores.**

Autores	Journal / ano	Modelo animal	Intervenção	Sítio da estimulação	Duração mínima da FA (segundos)	Duração média da FA (segundos)	% inducibilidade
1. Guasch et al.	JACC 2013	Ratos	Sedentários vs. treinado	atrial	1	Não descrito	15% SHAM vs. 65% treinados (p<0,001)
2. Zhang et al.,	J Cardiac Fail 2014	Ratos	ICC vs. ICC + tratamento com T4	atrial	≥ 0,5	21 ± 19,9 ICC vs. 0,3 ± 0,2 ICC + T4	73% ICC vs. 29% ICC + T4 (p=0,027)
3. Iwasaki et al.	Heart Rhythm 2012	Ratos	Sham vs. apnéia	atrial	2	Intacto 100 ± 35 vs. 91 ± 35	13% SHAM vs. 56% apnéia (p<0,05)
4. Watanabe et al	Am J Physiol Heart Circ 2012	Ratos	Sham versus diabéticos (DM)	Coração isolado - Langendorff	> 0,1	Sham 0,9 ± 0,3 vs. DM 2,4 ± 0,6	Não descreveu
5. Lammers et al	Cell Physiol Biochem 2012	Ratos	Sham versus Aldosterona	Transesofágico	2	Sham 38,3±6,9 vs. 85,8±13,4	100% (induziu em todos animais de ambos os grupos)
6. Sugiyama et al	J Pharmacol Science 2005	Ratos	Sham versus pilsicainida	Transesofágico	2	Sham 9,1 ± 3,1 vs. 11,7 ± 3,5 tratado	100% (induziu em todos animais antes de testar fármaco)
7. Haugan	J Cardiovas Pharm 2004	Ratos	Sham versus asfixia	Transesofágico	Não descreveu	16 ± 4 vs 40 ± 2 asfixia	6% sham versus 91% asfixia p<0.001
8. Verheule et al.	Circ Res 2004	Camundongos knockout TGF-β1	Sham versus knockout	Transesofágico	2	12±2,7 Knockout	0% sham versus 48% knockout p<0.001
9. Schrickel et al	Basic Card Res 2002	Camundongos	EEF apenas	Transesofágico	1	26,9 ± 42,6	10 % versus 90% indução p<0.001

## 5.1 Limitações

Este estudo foi realizado em ratos, portanto, os resultados não podem ser diretamente extrapolados para humanos. A indução da ICC e FA em nosso modelo difere da observada na prática clínica, onde as alterações teciduais se processam de maneira mais lenta e gradual. Embora a vulnerabilidade da FA tenha aumentado, não está claro se arritmias atriais espontâneas ocorrem. Os critérios utilizados para medir o comprimento do ciclo de FA (AFCL) foram arbitrários e sujeitos a viés de seleção. O grau de disfunção sistólica do ventrículo esquerdo foi determinado apenas pela ecocardiografia e tamanho do infarto não foi avaliado. As medidas hemodinâmicas não foram realizadas, no entanto apresentam boas correlações com os parâmetros da ecocardiografia (Antonio et al., 2009). De nota, os valores de fração de ejeção de nossos animais ablacionados e SHAM são comparáveis a outros modelos (Stein et al., 2007; Guasch et al., 2013; Cho et al., 2014; Pasqualin et al., 2016). Disfunção ventricular sistólica discreta foi consistentemente induzida em nosso modelo com valores comparáveis a previamente descritos (Boixel et al., 2003). Curiosamente, a

eplerenona reduziu a incidência de FA em pacientes com insuficiência cardíaca leve (Swedberg et al., 2012). Como a formação da lesão por RF pode ser facilmente controlada no cenário experimental (Wittkamp, Nakagawa, 2006; Ikeda et al., 2014), nosso modelo tem o potencial de modular o tamanho da lesão do ventrículo esquerdo, reproduzindo vários graus de insuficiência cardíaca. A força de contato eletrodo-tecido é um fator chave no tamanho da lesão de RF. Infelizmente, nosso cateter customizado ainda não está equipado com tecnologia de sensor de força de contato, o que poderia melhorar ainda mais a reprodutibilidade do tamanho do infarto (IKEDA et al., 2014). Uma outra possível limitação deste estudo refere-se ao fato de que o EEF, histologia e análise biomolecular foram avaliados apenas no final do experimento. Estudos adicionais com diferentes períodos de avaliação e análise molecular detalhada pode ser útil no esclarecimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos em diferentes estágios de ICC e períodos de tratamento com antifibrótico.

## 6 CONCLUSÕES

Ratos com insuficiência cardíaca leve induzida pela ablação por RF do ventrículo esquerdo exibem pronunciado remodelamento estrutural atrial e aumento da vulnerabilidade à FA. Essas características reproduzem as da insuficiência cardíaca induzida pela oclusão coronariana. A baixa mortalidade e alta reprodutibilidade do tamanho do infarto do miocárdio do ventrículo esquerdo associado ao nosso modelo o torna atraente para o estudo do substrato de fibrilação atrial na insuficiência cardíaca. A espironolactona reduziu a fibrose atrial como esperado, porém não alterou a inducibilidade da FA, possivelmente devido a alterações eletrofisiológicas permanentes induzidas pela ICC.

## 7 REFERÊNCIAS

- Chugh SS, Havmoeller R, Narayanan K, Singh D, Rienstra M, Benjamin EJ, Gillum RF, Kim YH, McAnulty JH Jr, Zheng ZJ, Forouzanfar MH, Naghavi M, Mensah GA, Ezzati M, Murray CJ. Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: a Global Burden of Disease 2010 Study. *Circulation*. 2014 Feb 25;129(8):837-47. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005119.
- Stambler BS, Laurita KR. Atrial fibrillation in heart failure: steady progress but still a long way to go. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008;1:77-79. DOI: 10.1161/CIRCEP.108.785071.
- Wang TJ, Larson MG, Levy D, Vasan RS, Leip EP, Wolf PA, D'Agostino RB, Murabito JM, Kannel WB, Benjamin EJ. Temporal relations of atrial fibrillation and congestive heart failure and their joint influence on mortality: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2003 Jun 17;107(23):2920-5 DOI: 10.1161/01.CIR.0000072767.89944.6E
- Nattel S, Burstein B, Dobrev D. Atrial remodeling and atrial fibrillation: mechanisms and implications. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008;1:62-73. DOI: 10.1161/CIRCEP.107.754564.
- Farré J, Wellens HJ. Philippe Coumel: a founding father of modern arrhythmology. *Europace* 2004 6: 464-465. DOI: 10.1016/j.eupc.2004.06.001.
- Everett TH, Olgin JE. Atrial fibrosis and the mechanisms of atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2007;4:S24-77. DOI 10.1016/j.hrthm.2006.12.040.
- Burstein B, Comtois P, Michael G, Nishida K, Villeneuve L, Yeh YH, Nattel S. Changes in connexin expression and the atrial fibrillation substrate in congestive heart failure. *Circ Res* 2009;105:1213-1222. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.183400.
- Jennings MM, Donahue JK. Connexin Remodeling Contributes to Atrial Fibrillation. *J Atr Fibrillation* 2013;6:839. DOI: 10.4022/jafib.839.
- Molina CE, Abu-Taha IH, Wang Q, Roselló-Díez E, Kamler M, Nattel S, Ravens U, Wehrens XH, Hove-Madsen L, Heijman J, Dobrev D. Profibrotic, Electrical, and Calcium-Handling Remodeling of the Atria in Heart Failure Patients With and Without Atrial Fibrillation. *Front Physiol*. 2018 Oct 9;9:1383. DOI: 10.3389/fphys.2018.01383.
- Bond RC, Bryant SM, Watson JJ, Hancox JC, Orchard CH, James AF. Reduced density and altered regulation of rat atrial L-type Ca<sup>2+</sup> current in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2017 Mar 1;312(3):H384-H391. DOI: 10.1152/ajpheart.00528.2016.
- Ouadid H, Albat B, Nargeot J. Calcium currents in diseased human cardiac cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 1995; 25, 282–291. DOI: 10.1097/00005344-199502000-00014
- Li D, Melnyk P, Feng J, Wang Z, Petrecca K, Shrier A, et al. Effects of experimental heart failure on atrial cellular and ionic electrophysiology. *Circulation* 2000; 101, 2631–2638. doi: 10.1161/01.CIR.101.22.2631



Boixel C, Gonzalez W, Louedec L, and Hatem SN. Mechanisms of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current downregulation in rat atrial myocytes during heart failure. *Circ. Res.* 2001; 89, 607–613. DOI: 10.1161/hh1901.096702

Cha TJ, Ehrlich JR, Zhang L, and Nattel S. Atrial ionic remodeling induced by atrial tachycardia in the presence of congestive heart failure. *Circulation* 2004a; 110, 1520–1526. DOI: 10.1161/01.CIR.0000142052.03565.87

Cha TJ, Ehrlich JR, Zhang L, Shi YF, Tardif JC, Leung TK, et al. Dissociation between ionic remodeling and ability to sustain atrial fibrillation during recovery from experimental congestive heart failure. *Circulation* 2004b; 109, 412–418. DOI: 10.1161/01.CIR.0000109501.47603.0C

Sridhar A, Nishijima Y, Terentyev D, Khan M, Terentyeva R, Hamlin RL, et al. Chronic heart failure and the substrate for atrial fibrillation. *Cardiovasc. Res.* 2009; 84, 227–236. DOI: 10.1093/cvr/cvp216

Clarke JD, Caldwell JL, Horn MA, Bode EF, Richards MA, Hall MC, et al. Perturbed atrial calcium handling in an ovine model of heart failure: potential roles for reductions in the L-type calcium current. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2015; 79, 169–179. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.11.017

Le Grand BL, Hatem S, Deroubaix E, Couetil JP, Coraboeuf E. Depressed transient outward and calcium currents in dilated human atria. *Cardiovasc. Res.* 1994; 28, 548–556. DOI: 10.1093/cvr/28.4.548

Deroubaix E, Folliguet T, Rucker-Martin C, Dinanian S, Boixel C, Validire P, et al. Moderate and chronic hemodynamic overload of sheep atria induces reversible cellular electrophysiologic abnormalities and atrial vulnerability. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004; 44, 1918–1926. DOI: 10.1016/j.jacc.2004.07.055

Dinianian S, Boixel C, Juin C, Hulot JS, Coulombe A, Rucker-Martin C, et al. Downregulation of the calcium current in human right atrial myocytes from patients in sinus rhythm but with a high risk of atrial fibrillation. *Eur. Heart J.* 2008; 29, 1190–1197. DOI: 10.1093/eurheartj/ehn140

Trafford AW, Diaz ME, Eisner DA. Coordinated control of cell  $\text{Ca}^{2+}$  loading and triggered release from the sarcoplasmic reticulum underlies the rapid inotropic response to increased L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current. *Circ. Res.* 2001; 88, 195–201. DOI: 10.1161/01.RES.88.2.195

Clarke JD, Caldwell JL, Pearman CM, Eisner DA, Trafford AW, Dibb KM. Increased Ca buffering underpins remodelling of  $\text{Ca}^{2+}$  handling in old sheep atrial myocytes. *J. Physiol.* 2017; 595, 6263–6279. DOI: 10.1113/JP274053

Hohendanner F, Walther S, Maxwell JT, Kettlewel S, Awad S, Smith GL, et al. Inositol-1,4,5-trisphosphate induced  $\text{Ca}^{2+}$  release and excitation-contraction coupling in atrial myocytes from normal and failing hearts. *J. Physiol.* 2015; 593, 1459–1477. doi: 10.1113/jphysiol.2014.283226

Hohendanner F, DeSantiago J, Heinzel FR, Blatter LA. Dyssynchronous calcium removal in heart failure-induced atrial remodeling. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2016; 311, H1352–H1359. DOI: 10.1152/ajpheart.00375.2016

Aistrup GL, Arora R, Grubb S, Yoo S, Toren B, Kumar M, et al. Triggered intracellular calcium waves in dog and human left atrial myocytes from normal and failing hearts. *Cardiovasc. Res.* 2017; 113, 1688–1699. DOI: 10.1093/cvr/cvx167

Lee KW, Everett THIV, Rahmutula D, Guerra JM, Wilson E, Ding C, et al. Pirfenidone prevents the development of a vulnerable substrate for atrial fibrillation in a canine model of heart failure. *Circulation* 2016; 114, 1703–1712. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.624320

Le Grand B, Letienne R, Dupont-Passelaigue E, Lantoin-Adam F, Longo F, David-Dufilho M, et al. F 16915 prevents heart failure-induced atrial fibrillation: a promising new drug as upstream therapy. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* 2014; 387, 667–677. DOI: 10.1007/s00210-014-0975-3

Chaugai S, Meng WY, Ali Sepehry A. Effects of RAAS blockers on atrial fibrillation prophylaxis: an updated systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 2016; 21, 388–404. DOI: 10.1177/1074248415619490

Dibb KM, Clarke JD, Horn MA, Richards MA, Graham HK, Eisner DA, et al. Characterization of an extensive transverse tubular network in sheep atrial myocytes and its depletion in heart failure. *Circ. Heart Fail.* 2009; 2, 482–489. DOI: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.852228

Lenaerts I, Bito V, Heinzel FR, Driesen RB, Holemans P, D'Hooge J, et al. Ultrastructural and functional remodeling of the coupling between Ca<sup>2+</sup> influx and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release in right atrial myocytes from experimental persistent atrial fibrillation. *Circ. Res.* 2009; 105, 876–885. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.206276

Brandenburg S, Kohl T, Williams GS, Gusev K, Wagner E, Rog-Zielinska EA, et al. Axial tubule junctions control rapid calcium signaling in atria. *J. Clin. Invest.* 2016; 126, 3999–4015. DOI: 10.1172/JCI88241

Yeh YH, Wakili R, Qi XY, Chartier D, Boknik P, Käab S, Ravens U, Coutu P, Dobrev D, Nattel S. Calcium-handling abnormalities underlying atrial arrhythmogenesis and contractile dysfunction in dogs with congestive heart failure. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2008 Jun 1;1(2):93-102. DOI: 10.1161/CIRCEP.107.754788.

Dinanian S, Boixel C, Juin C, Hulot JS, Coulombe A, Rucker-Martin C et al. Downregulation of the calcium current in human right atrial myocytes from patients in sinus rhythm but with a high risk of atrial fibrillation. *Eur. Heart J.* 2008; 29, 1190–1197. doi: 10.1093/eurheartj/ehn140

Opacic D, van Bragt KA, Nasrallah HM, Schotten U, Verheule S. Atrial metabolism and tissue perfusion as determinants of electrical and structural remodelling in atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 2016 Apr 1;109(4):527-41. DOI: 10.1093/cvr/cvw007.

Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. 1999 Sep 2;341(10):709-17. DOI: 10.1056/NEJM199909023411001.

Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M; Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2003 Apr 3;348(14):1309-21. Epub 2003 Mar 31. DOI 10.1056/NEJMoa030207.

Zannad F1, McMurray JJ, Krum H, van Veldhuisen DJ, Swedberg K, Shi H, Vincent J, Pocock SJ, Pitt B; EMPHASIS-HF Study Group. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med*. 2011 Jan 6;364(1):11-21. DOI: 10.1056/NEJMoa1009492.

Zannad F, Alla F, Dousset B, Perez A, Pitt B. Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). Rales Investigators. *Circulation*. 2000 Nov 28;102(22):2700-6. DOI: 10.1161/01.CIR.102.22.2700.

Esposito CT, Varahan S, Jeyaraj D, Lu Y, Stambler BS. Spironolactone improves the arrhythmogenic substrate in heart failure by preventing ventricular electrical activation delays associated with myocardial interstitial fibrosis and inflammation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2013 Jul;24(7):806-12. DOI: 10.1111/jce.12115.

Lammers C, Dartsch T, Brandt MC, Rottländer D, Halbach M, Peinkofer G, Ockenpoehler S, Weiergraeber M, Schneider T, Reuter H, Müller-Ehmsen J, Hescheler J, Hoppe UC, Zobel C. Spironolactone prevents aldosterone induced increased duration of atrial fibrillation in rat. *Cell Physiol Biochem* 2012;29:833-840. DOI: 10.1159/000178483.

Tanaka-Esposito C, Varahan S, Jeyaraj D, Lu Y, Stambler BS. Eplerenone-mediated regression of electrical activation delays and myocardial fibrosis in heart failure. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2014;25:556-577. DOI: 10.1111/jce.12390.

Goette A, Hoffmanns P, Enayati W, et al. Effect of successful electrical cardioversion on serum aldosterone in patients with persistent atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 2001;88:906 –9.

Tsai CT, Chiang FT, Tseng CD, Hwang JJ, Kuo KT, Wu CK, Yu CC, Wang YC, Lai LP, Lin JL. Increased expression of mineralocorticoid receptor in human atrial fibrillation and a cellular model of atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Feb 23;55(8):758-70. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.09.045.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 1979;44:503–512. DOI: 10.1161/01.RES.44.4.503.

Opitz CF, Mitchell GF, Pfeffer MA, Pfeffer JM. Arrhythmias and death after coronary artery occlusion in the rat: continuous telemetric ECG monitoring in conscious, untethered rats. *Circulation* 1995;92:253-261. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.92.2.253>

Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res* 1985;57:84-90. <https://doi.org/10.1161/01.RES.57.1.84>

Antonio EL, Dos Santos AA, Araujo SR, Bocalini DS, Dos Santos L, Fenelon G, Franco MF, Tucci PJ. Left ventricle radio-frequency ablation in the rat: a new model of heart failure due to myocardial infarction homogeneous in size and low in mortality. *J Card Fail* 2009;15:540-8. DOI: 10.1016/j.cardfail.2009.01.007.

Dos Santos LF, Antonio E, Serra A, Venturini G, Okada M, Araújo S, Tucci P, De Paola A, Fenelon G. Radiofrequency ablation does not induce apoptosis in the rat myocardium. *Pacing Clin Electrophysiol* 2012;35:449-55. DOI: 10.1111/j.1540-8159.2011.03306.x

Dos Santos LF, Antonio EL, Serra AJ, Venturini G, Montemor J, Okada M, Araújo S, Tucci P, de Paola A, Fenelon G. Thermotolerance does not reduce the size or remodeling of radiofrequency lesions in the rat myocardium. *J Interv Card Electrophysiol* 2013;36:5-11. DOI: 10.1007/s10840-012-9746-6.

Wakili R, Voigt N, Käb S, Dobrev D, Nattel S. Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. *J Clin Invest* 2011;121: 2955–2968. DOI: 10.1172/JCI46315.

Verheule S, Sato T, Everett T, Engle SK, Otten D, Rubart-von der Lohe M et al. Increased vulnerability to atrial fibrillation in transgenic mice with selective atrial fibrosis caused by overexpression of TGF-beta1. *Circ Res* 2004; 94:1458–1465. DOI: 10.1161/01.RES.0000129579.59664.9d.

Everett TH, Olgin JE. Atrial fibrosis and the mechanisms of atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2007 4:S24 –S27. DOI: 10.1016/j.hrthm.2006.12.040.

Kanashiro RM, Saraiva RM, Alberta A, Antonio EL, Moisés VA, Tucci PJ. Immediate functional effects of left ventricular reduction: a Doppler echocardiographic study in the rat. *Journal of Cardiac Failure* 2006;12:163–169. DOI <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2005.09.007>.

Zhang Y, Dedkov E, Lee B, Li Y, Pun K, Gerdes AM. Thyroid hormone replacement therapy attenuates atrial remodeling and reduces atrial fibrillation inducibility in a rat myocardial infarction-heart failure model. *J Card Fail* 2014;20:1012-1019. DOI: 10.1016/j.cardfail.2014.10.003.

Boixel C, Fontaine V, Rücker-Martin C, Milliez P, Louedec L, Michel JB, Jacob MP, Hatem SN. Fibrosis of the left atria during progression of heart failure is associated with increased matrix metalloproteinases in the rat. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Jul 16;42(2):336-44. DOI: 10.1016/S0735-1097(03)00578-3.

Fenelon G, Stambler BS, Huvelle E, Brugada P, Stevenson WG; European VENTAK MINI Investigator Group. Left ventricular dysfunction is associated with prolonged

average ventricular fibrillation cycle length in patients with implantable cardioverter defibrillators. *J Interv Card Electrophysiol.* 2002;7:249-54. <https://doi.org/10.1023/A:1021393525558>.

Yuen HC, Roh SY, Lee DI, Ahn J, Kim DH, Shim J, Park SW, Kim YH. Atrial fibrillation cycle length as a predictor for the extent of substrate ablation. *Europace.* 2015;17:1391-401. doi: 10.1093/europace/euu330.

Milliez P, Deangelis N, Rucker-Martin C, Leenhardt A, Vicaut E, Robidel E et al. Spironolactone reduces fibrosis of dilated atria during heart failure in rats with myocardial infarction. *Eur Heart J* 2005;26:2193–2199. DOI: 10.1093/eurheartj/ehi478.

Zhao J1, Li J, Li W, Li Y, Shan H, Gong Y, Yang B. Effects of spironolactone on atrial structural remodelling in a canine model of atrial fibrillation produced by prolonged atrial pacing. *Br J Pharmacol.* 2010;159:1584-94. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00551.x.

Wittkamp FH, Nakagawa H. RF catheter ablation: Lessons on lesions. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2006;29:1285-97. DOI: 10.1111/j.1540-8159.2006.00533.x.

Nishida K, Michael G, Dobrev D, Nattel S. Animal models for atrial fibrillation: clinical insights and scientific opportunities. *Europace* 2010;12:160-72. DOI: 10.1093/europace/eup328.

Okoshi MP, Cezar MDM, Iyomasa RM, Silva MB, Costa LCO, Martinez PF, Campos DHS, Damatto RL, Minicucci MF, Cicogna AC, Okoshi K. Effects of early aldosterone antagonism on cardiac remodeling in rats with aortic stenosis-induced pressure overload. *Int J Cardiol.* 2016 Nov 1;222:569-575. DOI: 10.1016/j.ijcard.2016.07.266.

Reil JC, Hohl M, Selejan S, Lipp P, Drautz F, Kazakow A, Münz BM, Müller P, Steendijk P, Reil GH, Allessie MA, Böhm M, Neuberger HR. Aldosterone promotes atrial fibrillation. *Eur Heart J.* 2012 Aug;33(16):2098-108. DOI: 10.1093/eurheartj/ehr266.

Lugenbiel P, Wenz F, Govorov K, Schweizer PA, Katus HA, Thomas D. Atrial fibrillation complicated by heart failure induces distinct remodeling of calcium cycling proteins. *PLoS One.* 2015 Mar 16;10(3):e0116395. DOI: 10.1371/journal.pone.0116395.

Pluteanu F, Heß J, Plackic J, Nikonova Y, Preisenberger J, Bukowska A, Schotten U, Rinne A, Kienitz MC, Schäfer MK, Weihe E, Goette A, Kockskämper J. Early subcellular Ca<sup>2+</sup> remodelling and increased propensity for Ca<sup>2+</sup> alternans in left atrial myocytes from hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 2015 Apr 1;106(1):87-97. DOI: 10.1093/cvr/cvv045.

Igarashi T, Finet JE, Takeuchi A, Fujino Y, Strom M, Greener ID, Rosenbaum DS, Donahue JK. Connexin gene transfer preserves conduction velocity and prevents atrial fibrillation. *Circulation.* 2012;125(2):216-25. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.053272.

Iwasaki YK, Kato T, Xiong F, Shi YF, Naud P, Maguy A, Mizuno K, Tardif JC, Comtois P, Nattel S. Atrial Fibrillation Promotion With Long-Term Repetitive Obstructive Sleep Apnea in a Rat Model. *J Am Coll Cardiol* 2014;64:2013-23. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.05.077.

Watanabe M, Yokoshiki H, Mitsuyama H, Mizukami K, Ono T, Tsutsui H. Conduction and refractory disorders in the diabetic atrium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012 Jul;303(1):H86-95. DOI: 10.1152/ajpheart.00010.2012.

Sugiyama A, Takahara A, Honsho S, Nakamura Y, Hashimoto K. A simple in vivo atrial fibrillation model of rat induced by transesophageal atrial burst pacing. *J Pharmacol Sci*. 2005 Jul;98(3):315-8.

Haugan K, Lam HR, Knudsen CB, Petersen JS. Atrial fibrillation in rats induced by rapid transesophageal atrial pacing during brief episodes of asphyxia: a new in vivo model. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004 Jul;44(1):125-35.

Stein AB, Tiwari S, Thomas P, Hunt G, Levent C, Stoddard MF, Tang XL, Bolli R, Dawn B. Effects of anesthesia on echocardiographic assessment of left ventricular structure and function in rats. *Basic Res Cardiol*. 2007 Jan;102(1):28-41.

Guasch E, Benito B, Qi X, Cifelli C, Naud P, Shi Y, Mighiu A, Tardif JC, Tadevosyan A, Chen Y, Gillis MA, Iwasaki YK, Dobrev D, Mont L, Heximer S, Nattel S. Atrial fibrillation promotion by endurance exercise: demonstration and mechanistic exploration in an animal model. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Jul 2;62(1):68-77. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.01.091.

Cho KI, Koo SH, Cha TJ, Heo JH, Kim HS, Jo GB, Lee JW. Simvastatin attenuates the oxidative stress, endothelial thrombogenicity and the inducibility of atrial fibrillation in a rat model of ischemic heart failure. *Int J Mol Sci*. 2014 Aug 22;15(8):14803-18. DOI: 10.3390/ijms150814803.

Pasqualin RC, Mostarda CT, Souza LE, Vane MF, Sirvente R, Otsuki DA, Torres ML7, Irigoyen MC, Auler JO Jr. Sevoflurane preconditioning during myocardial ischemia-reperfusion reduces infarct size and preserves autonomic control of circulation in rats. *Acta Cir Bras*. 2016 May;31(5):338-45. DOI: 10.1590/S0102-8650201600500000008.

Swedberg K, Zannad F, McMurray JJ, Krum H, van Veldhuisen DJ, Shi H, Vincent J, Pitt B; EMPHASIS-HF Study Investigators. Eplerenone and atrial fibrillation in mild systolic heart failure: results from the EMPHASIS-HF (Eplerenone in Mild Patients Hospitalization And Survival Study in Heart Failure) study. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59:1598-603. DOI: 10.1016/j.jacc.2011.11.063.

Ikeda A, Nakagawa H, Lambert H, Shah DC, Fonck E, Yulzari A, Sharma T, Pitha JV, Lazzara R, Jackman WM. Relationship between catheter contact force and radiofrequency lesion size and incidence of steam pop in the beating canine heart: electrogram amplitude, impedance, and electrode temperature are poor predictors of electrode-tissue contact force and lesion size. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2014;7:1174-80. doi: 10.1161/CIRCEP.113.001094.

## Anexo



### *Comissão de Ética no Uso de Animais*

#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação celular, eletrofisiológica e molecular do remodelamento atrial em ratos com insuficiência cardíaca induzida pela ablação por radiofrequência [ ] impacto nos mecanismos da fibrilação atrial", protocolada sob o CEUA nº 8052201213, sob a responsabilidade de **Luís Felipe Neves dos Santos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 27/02/2014.

We certify that the proposal <sup>nn</sup>, utilizing Heterogenics rats, protocol number CEUA 8052201213, under the responsibility of **Luís Felipe Neves dos Santos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 02/27/2014.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **Janeiro** a **Janeiro**

Área: **Cardiologia/medicina**

Origem: **Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia - CEDEME**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **7 a 7 semanas**

N: **---**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **250 a 250 g**

Local do experimento:

São Paulo, 30 de setembro de 2018

Profa. Dra. Monica Levy Andersen  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa  
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo

## Apêndices

### Apêndice 1 – Artigo publicado em periódico internacional

IJC Heart & Vasculature 21 (2018) 22–28



Contents lists available at ScienceDirect

IJC Heart & Vasculature

journal homepage: <http://www.journals.elsevier.com/ijc-heart-and-vasculature>



## Atrial fibrillation promotion in a rat model of heart failure induced by left ventricle radiofrequency ablation

Luis dos Santos<sup>a,1</sup>, Ednei L. Antonio<sup>a,1</sup>, Andrey J. Serra<sup>b,1</sup>, Amanda Yoshizaki<sup>a,1</sup>, Larissa Seibt<sup>a,1</sup>, Flavio A. Silva<sup>a,1</sup>, Gisele K. Couto<sup>c,1</sup>, Luciana V. Rossoni<sup>c,1</sup>, Paulo Tucci<sup>a,1</sup>, Angelo A. de Paola<sup>a,1</sup>, Guilherme Fenelon<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Cardiology, Paulista School of Medicine, Federal University of São Paulo, Rua Pedro de Toledo 780 - 10º - Vila Clementino, 04039-082 São Paulo, SP, Brazil

<sup>b</sup> Biophotonics Program, Nove de Julho University (UNINOVE), Rua Vergueiro, 2352-49 - Vergueiro, 015 04-000 São Paulo, SP, Brazil

<sup>c</sup> Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, Av. Professor Lineu Prestes - 1524- Cidade Universitária, 05508-000 São Paulo, SP, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 28 June 2018

Accepted 11 September 2018

Available online xxxxx

#### Keywords:

Radiofrequency ablation

Atrial fibrillation

Heart failure

Atrial fibrillation

### ABSTRACT

**Background:** Atrial fibrillation (AF) frequently coexists with congestive heart failure (CHF). The increased susceptibility to AF in CHF has been attributed to a variety of structural and electrophysiological changes in the atria, particularly dilation and interstitial fibrosis. We evaluated atrial remodeling and AF vulnerability in a rat model of CHF induced by left ventricle (LV) radiofrequency (RF) ablation.

**Methods:** Wistar rats were divided into 3 groups: RF-induced CHF (Ab, n = 36), CHF animals treated with spironolactone (AbSpi, n = 20) and sham controls (Sham, n = 29). After 12 weeks, animals underwent echocardiographic and electrophysiological evaluation and were sacrificed for histological (atrial fibrosis) and Western blotting (TGF-β1, collagen I/III, connexin 43 and Cav1.2) analysis.

**Results:** Mild LV dysfunction and marked atrial enlargement were noted in both ablated groups. AF inducibility (episodes ≥2 s) increased in the Ab group compared to sham animals (31/36, 86%; vs. 15/29, 52%; p = 0.005), but did not differ from the AbSpi group (16/20, 80%; p = NS). Sustained AF (>30 s) was also more frequent in the Ab group compared to shams (56% vs. 28%; p = 0.04). Spironolactone reduced atrial fibrosis (p < 0.01) as well as TGF-β1 (p < 0.01) and collagen I/III (p < 0.01) expression but did not affect connexin 43 and Cav1.2 expression.

**Conclusions:** Rats with RF-induced CHF exhibit pronounced atrial structural remodeling and enhanced AF vulnerability. This model may be useful for studying AF substrate in CHF.

© 2018 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

### 1. Introduction

Atrial fibrillation (AF) frequently coexists with congestive heart failure (CHF), as CHF promotes AF and as AF worsens CHF [1]. The increased susceptibility to AF in CHF has been attributed to a variety of structural and electrophysiological changes in the atria, particularly dilation and interstitial fibrosis [2]. Heart failure increases expression of transforming growth factor beta 1 (TGF-β1) which plays a significant role in the genesis of atrial fibrosis [3]. Furthermore, CHF is associated with decreased expression of connexins 40 and 43 (major atrial gap junctional proteins) [4,5]. These abnormalities promote slow local conduction favoring sustained reentry. In addition, heart failure-induced atrial remodeling

is commonly associated with reduced expression of L-type  $Ca^{2+}$  channels which may change action potential configuration and atrial refractoriness [6]. It has been shown in animal models that mineralocorticoid receptor blockers such as spironolactone and eplerenone, which exhibit potent antifibrotic properties, attenuate CHF-induced atrial fibrosis and atrial tachyarrhythmias [1,7,8].

The rat model of myocardial infarction induced by ligation of the left coronary artery has long been validated to simulate human CHF and left atrial remodeling [9]. However, this model has drawbacks such as elevated significant immediate mortality and high variability of myocardial infarction size [10–11]. As an alternative to coronary occlusion, we have recently demonstrated a method of inducing myocardial infarction in rats by left ventricle radiofrequency (RF) ablation which is associated with homogeneous infarct size and low mortality [12–14]. In addition, the histopathologic evolution, severity of left ventricular dysfunction and CHF outcome reproduced a myocardial infarction from coronary occlusion [12]. However, atrial structural alterations and AF susceptibility were not evaluated.

\* Corresponding author.

E-mail address: [guilhermefenelon@uol.com.br](mailto:guilhermefenelon@uol.com.br) (G. Fenelon).

<sup>1</sup> This author takes responsibility for all aspects of the reliability and freedom from bias of the data presented and their discussed interpretation.



We hypothesized that our CHF model promotes left atrial dilation and interstitial fibrosis increasing vulnerability to AF. Therefore, we have assessed atrial structural remodeling and induction of AF in rats with CHF induced by RF ablation. Additionally, we evaluated the impact of spironolactone on atrial fibrosis and AF inducibility.

## 2. Methods

This study was approved by the Ethics in Research Committee of the Federal University of São Paulo (protocol number: 8052201213) and was conducted in accordance with "Laws related to animal models in Brazil" (<http://www.ccs.ufpb.br/pesqccs/anim.htm>).

### 2.1. Open-chest preparation and ablation protocol

Under sterile conditions, 85 male Wistar rats (300 to 320 g) were anesthetized, mechanically ventilated, and a thoracotomy in the 4th intercostal space was performed to expose the heart. One RF ablation (12 W for 12 s) per animal was performed on the free wall of the left ventricle using a customized catheter as previously described [12–14]. Then, the heart was rapidly placed back inside the thorax, and the chest was closed with simple suture. After recovery, animals were maintained for 12 weeks in conditioned cages in a light cycle of 12/12 h.

### 2.2. Subdivision of animals

Three groups were studied: (1) CHF induced by left-ventricle RF ablation (Ab group,  $n = 36$ ); (2) CHF animals treated with spironolactone (100 mg/kg per gavage once daily) during the 12 weeks of follow-up (AbSpi group,  $n = 20$ ); and (3) sham-operated animals (SHAM,  $n = 29$ ) which underwent thoracotomy and exposure of the heart but not ablation.

At the end of the follow-up period (12 weeks), rats were re-anesthetized for echocardiography and electrophysiological study. After that, animals were sacrificed, and the hearts excised for left atrial histological and Western blotting evaluation.

### 2.3. Echocardiography

Transthoracic echocardiography studies were performed using the HP SONOS 5500 echocardiograph (Philips Medical System, Andover, MA) with a 12 MHz transducer, 2 cm depth. In addition to left ventricular function analysis, left atrial diameter, area, and left atrial/aorta ratio were also evaluated as previously described [15].

### 2.4. Arrhythmia inducibility

Percutaneous electrophysiological studies were performed using an octapolar catheter (BPR catheter 1.6F, AD instruments) positioned in the right atrium via the right jugular vein [16]. Surface ECG and bipolar intracardiac electrograms (3 channels) were displayed on a monitor and stored by a computerized recording system (PowerLab®, Australia). Sinus node function and atrioventricular conduction intervals were not evaluated. Arrhythmia inducibility was tested with up to 5 burst pacing attempts at 20 and 40 milliseconds for a maximum of 30 s using current strengths from 1200 to 1500 mV (STG3008 stimulator, MultiChannels – Reutlingen, Germany). AF was defined as  $\geq 2$  s of irregular atrial electrogram ( $>800$  bpm) with irregular ventricular response. AF episodes were categorized as follows: a) No AF induction (episodes  $<2$  s); b) Non-sustained AF ( $\geq 2$  s and  $\leq 30$  s); c) sustained AF ( $>30$  second duration); d) sustained long-lasting AF ( $>15$  minute–900 second duration). AF duration was measured from the end of the burst stimulus until the first P wave of sinus rhythm post-AF and was determined in each rat as the mean duration of all AF episodes.

### 2.5. Atrial refractoriness analysis

Due to poor catheter stability, we were not able to reliably assess right atrial refractory periods by extra-stimulus testing. Therefore, we used the AF cycle length recorded in the intracavitary electrodes as an estimate of atrial refractoriness [17–18]. The AF cycle length analysis consisted of manually measuring using electronic calipers (same blind observer) the atrial electrical activity intervals (averaging 10 to 20 cycles) during the 31st second of the AF episode of animals with sustained AF. We have chosen this time frame to allow accommodation of atrial refractoriness. The mean, median and shortest intervals of AF cycles were evaluated. AF displaying multicomponent fractionated electrograms or with motion artifacts were excluded.

### 2.6. Histology

Atrial fibrosis was quantified with Picrosirius red staining [19]. Quantitative analysis of collagen (measured in pixels) was performed after sequential images (10 fields per atrium) along the atrial fibers and blindly measured using Image Tool® software.

### 2.7. Western blotting

To determine protein expression of TGF $\beta$ 1, collagen I/III, connexin 43 and L-type  $Ca^{2+}$  channels (Cav1.2) left atria were homogenized with cold RIPA lysis buffer (RIPA, Millipore, USA), containing phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF, 1 mM), sodium orthovanadate (10 mM), protease inhibitor cocktail (2  $\mu$ l/ml, Sigma, USA), sodium fluoride (100 mM) and sodium pyrophosphate (10 mM) [14]. The homogenates were subsequently centrifuged (1500g for 20 min at 4 °C) and the supernatants were isolated. Equal amounts of proteins (30  $\mu$ g) of the samples, the molecular weight marker (Precision Plus Protein, Kaleidoscope, Bio-Rad, USA), and positive controls (30  $\mu$ g of fibroblast homogenates as a positive control for collagen I/III, TGF $\beta$ 1 and Cav1.2, and 30  $\mu$ g of mouse encephalon homogenates as a positive control for connexin 43) were electrophoretically separated on gradient polyacrylamide gel (4–20%, Bio-Rad, USA) in an apparatus for minigel (Mini Protean III, Bio-Rad, USA) and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Amersham-GE Healthcare, UK) overnight at 4 °C using a Mini Trans-Blot Cell system (Bio-Rad, USA). After blocking, the membranes were incubated overnight at 4 °C with blocking solution containing the following antibodies: anti-collagen I/III (1:500; Calbiochem, California, USA, cat. n° 234169), anti-TGF $\beta$ 1 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA, cat. n° sc-146), anti-connexin 43 (1:5000, Abcam, Massachusetts, USA, cat. n° ab11370) or anti-Cav1.2 (1:1000, Alomone Labs, Jerusalem, Israel, cat. n° ACC-003). After labeling with primary antibody, the membranes were incubated for 90 min with blocking solution containing appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody (anti-rabbit; Jackson Immuno Research, USA): 1:10,000 for collagen I/III, 1:4000 for TGF $\beta$ 1 and Connexin 43 or 1:2000 for Cav1.2. After washing, the fluorescence kit detection reagents (ECL, Amersham-GE Healthcare, UK) were added and the membrane chemiluminescence was detected using Amersham Imager 600 (Amersham-GE Healthcare, UK). Optical densitometric analysis of the bands was performed by the Image J program (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). The loading control was validated by staining the membrane with Ponceau S.

### 2.8. Statistical analysis

Data were analyzed with the Prism 4.0 program (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, USA). The Fisher's exact test was used to compare AF inducibility. AF duration is expressed as median and interquartile range (25% to 75%) and was analyzed with a Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test. Data normality was examined with Shapiro-Wilk test. One-way ANOVA was applied to compare continuous

variables among groups followed by Tukey's tests. Results are shown as mean  $\pm$  standard deviation and significance level was set at  $p \leq 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Radiofrequency ablation

The ablation procedure was uneventful in all animals, with no acute complications. However, during follow-up, mortality rate was 16% ( $n = 7/43$ ) in the Ab group, 28% ( $n = 8/28$ ) in the AbSpi group, and 17% ( $n = 6/35$ ) in the sham group ( $p = \text{NS}$ ). All deaths occurred during the first 3 weeks after ablation and were related to severe heart failure or surgical complications. In the sham group, half of the deaths was caused by unexpected pulmonary infection (these 3 rats were housed in the same cage). These animals were excluded from the analysis.

#### 3.2. Echodopplercardiography

Twenty-nine animals in the sham group, 36 in the Ab group and 20 in the AbSpi group were evaluated by 2D echocardiography. Segmental contractile changes in the anterolateral wall, indicative of RF lesion, were observed in all ablated animals. In the Ab and AbSpi groups, respectively, there was dilation of the left ventricle (diastolic diameter  $0.93 \pm 0.10$  cm vs.  $0.95 \pm 0.06$  cm;  $p = \text{NS}$ ) and mild reduction of LV ejection fraction ( $57 \pm 11\%$  vs.  $52 \pm 7\%$ ;  $p = \text{NS}$ ). However, the degree of left atrium dilation was greater in the AbSpi group ( $0.69 \pm 0.09$  cm vs.  $0.75 \pm 0.06$  cm;  $p = 0.02$ ). In the sham group, left atrial diameter ( $0.62 \pm 0.08$  cm), left ventricle dimensions (diastolic diameter  $0.73 \pm 0.10$  cm) and ejection fraction ( $83 \pm 9\%$ ;  $p < 0.001$ ) were normal and significantly different ( $p < 0.001$ ) from ablated groups (Table 1).

#### 3.3. Electrophysiological study

Twenty-nine animals in the sham group, 36 in the Ab group and 20 in the AbSpi group underwent electrophysiological evaluation. As shown in Fig. 1 (panels A and B), AF inducibility (episodes  $\geq 2$  s of duration) was significantly increased in the Ab group compared to sham animals (31/36, 86%; vs. 15/29, 52%;  $p = 0.005$ ), but did not differ from the AbSpi group (16/20, 80%;  $p = \text{NS}$ ). AF tended to be more easily induced in the AbSpi group than in sham animals (80% vs. 52%;  $p = 0.07$ ). Sustained AF ( $>30$  s of duration) was also induced more frequently in the Ab group compared to sham animals (20/36, 56%; vs. 8/29, 28%;  $p = 0.04$ ), with no difference from the AbSpi group (7/20, 35%;  $p = \text{NS}$ ). Inducibility of sustained AF did not vary between AbSpi and sham groups (35% vs. 28%;  $p = \text{NS}$ ).

**Table 1**  
Echocardiographic variables for ablation, ablation + spironolactone and sham groups 12 weeks after the ablation procedure.

Variable	SHAM ( $n = 29$ )	Ab ( $n = 36$ )	AbSpi ( $n = 20$ )
Body weight (g)	$422.5 \pm 50.89$	$435.4 \pm 49.55$	$430.1 \pm 34.46$
LA (cm) - M mode	$0.62 \pm 0.08$	$0.69 \pm 0.09^{**}$	$0.75 \pm 0.06^{***\#}$
ML (cm) 4-chamber view	$0.53 \pm 0.05$	$0.59 \pm 0.09^{*}$	$0.61 \pm 0.08^{**}$
IS (cm) 4-chamber view	$0.61 \pm 0.07$	$0.69 \pm 0.08^{***}$	$0.73 \pm 0.06^{***}$
LA area (cm <sup>2</sup> ) 4-chamber view	$0.28 \pm 0.05$	$0.36 \pm 0.08^{***}$	$0.38 \pm 0.07^{***}$
LA area (cm <sup>2</sup> ) Bi-mode	$0.42 \pm 0.07$	$0.55 \pm 0.13^{***}$	$0.59 \pm 0.19^{***}$
LA/Ao ratio Bi-mode	$1.29 \pm 0.18$	$1.62 \pm 0.26^{***}$	$1.7 \pm 0.22^{***}$
LVDD (cm)	$0.73 \pm 0.10$	$0.93 \pm 0.10^{***}$	$0.95 \pm 0.06^{***}$
LVSD (cm)	$0.37 \pm 0.17$	$0.68 \pm 0.09^{***}$	$0.72 \pm 0.06^{***}$
Ejection fraction (%)	$83 \pm 8.9$	$57 \pm 11^{***}$	$52 \pm 7.2^{***}$

Data described as mean  $\pm$  standard deviation. Sham: sham group; Ab: ablation group; AbSpi: ablation treated with spironolactone group; LA: left atrium; ML: medial-lateral left atrium measured in the 4-chamber view; IS: inferior-superior left atrium measured in the 4-chamber view; LA/Ao: left atrium/aorta ratio measured by the short axis; LVDD: left ventricle diameter in diastole; LVSD: left ventricle diameter in systole; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  versus SHAM; # $p = 0.02$  versus Ab.

Further, as illustrated in Fig. 1 (panel C), long lasting AF episodes ( $>15$  min) occurred more frequently in the Ab group than in sham animals (12/36, 33% vs. 1/29, 3%;  $p = 0.004$ ), but without difference as compared to the AbSpi group (5/20, 25%;  $p = \text{NS}$ ). Long lasting AF was also more commonly induced in the AbSpi group than in sham animals (25% vs. 3%;  $p = 0.03$ ).

Induced AF duration was not statistically different among the 3 study groups ( $p = 0.07$ ), although there was a tendency toward increased AF duration in the Ab group compared with sham and AbSpi groups. AF duration in the AbSpi group was comparable to sham animals (Fig. 1, panel D).

The AF cycle length could be assessed in 7 animals (24%) from the sham group, 16 (44%) from the Ab group and 6 (30%) from the AbSpi group. Although recorded mean, median and shortest AF cycle length were longer in the Ab group ( $36 \pm 13$  ms;  $36 \pm 12$  ms;  $32 \pm 12$  ms) as compared to the AbSpi group ( $31 \pm 3$  ms;  $31 \pm 3$  ms;  $28 \pm 4$  ms) and sham animals ( $30 \pm 4$  ms;  $30 \pm 8$  ms;  $29 \pm 4$  ms), these differences were not significant.

#### 3.4. Histology

Six animals in the sham group, 5 in the Ab group and 4 in the AbSpi group underwent histological evaluation. Left atrial interstitial fibrosis was increased in the Ab group as compared to sham animals ( $p < 0.001$ ) and AbSpi group ( $p < 0.01$ ). However, no differences in the amount of fibrosis were noted between AbSpi and sham rats (Fig. 2).

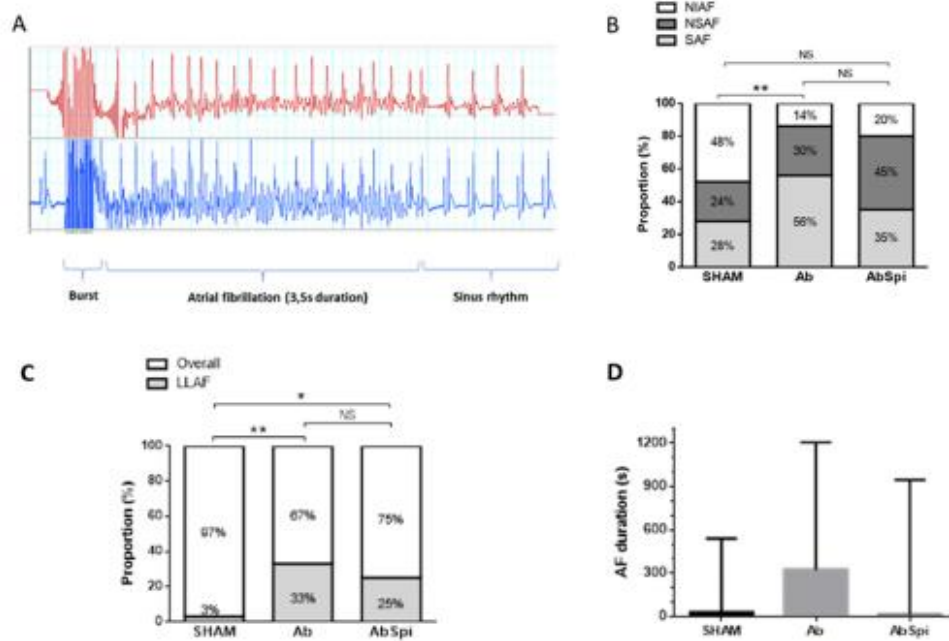
#### 3.5. Western blotting

Four animals in each group were used for TGF- $\beta$ 1, collagen I/III and Cav1.2 expression analysis. Expression of TGF- $\beta$ 1 was significantly increased in left atria of the Ab group as compared to sham and AbSpi animals ( $p < 0.01$ ), and collagen I/III also was significantly increased in the Ab group compared to sham and treated animals ( $p < 0.01$ ). The treatment with spironolactone (AbSpi group) significantly reduced both TGF- $\beta$ 1 and collagen I/III protein expression in left atria to values comparable to those observed in intact animals. In ablated animals (Ab and AbSpi), Cav1.2 expression was significantly reduced as compared to sham animals ( $p < 0.01$ ) with no difference between Ab and AbSpi groups. Expression of connexin 43 was evaluated in 5 animals from each group. In left atria from both ablated groups (Ab and AbSpi), expression of connexin 43 was significantly decreased as compared to sham animals ( $p < 0.01$ ) and connexin 43 expression did not differ between Ab and AbSpi animals (Fig. 3).

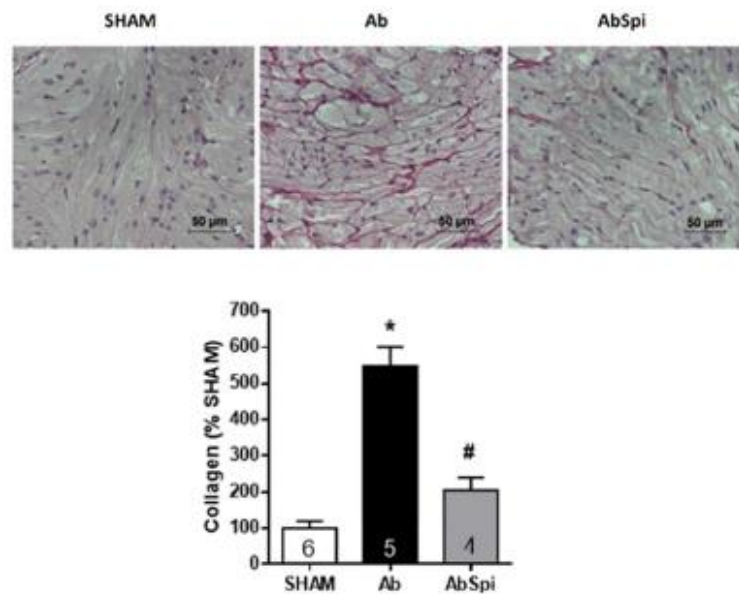
### 4. Discussion

The present study is the first to examine atrial remodeling and AF arrhythmogenesis in our recently developed rat model of heart failure induced by left ventricle RF ablation [12–14]. We have demonstrated that rats with RF-induced heart failure exhibit marked atrial structural changes (dilation and interstitial fibrosis) and enhanced AF vulnerability compared to sham controls. Further, likewise other heart failure models, treatment with the mineralocorticoid receptor blocker spironolactone attenuated atrial fibrosis [3,19,20].

Our heart failure model was developed as an alternative to the rat model of myocardial infarction induced by ligation of the left coronary artery, which has long been validated to simulate human congestive heart failure and left atrial remodeling [9–11]. However, the coronary occlusion model is limited by its elevated immediate mortality (within 24 h), which varies between 13% to 65%, and high variability of left ventricle myocardial infarction size ( $40 \pm 19\%$ ) [10–11]. Conversely, in our RF ablation model, immediate (24 h) mortality (7.5%) and myocardial infarction size dispersion ( $45 \pm 8\%$ ;  $p = 0.001$ ) are consistently lower compared with animals undergoing coronary occlusion [12–14]. Corroborating the



**Fig. 1.** (A) Atrial fibrillation (AF) induction (3.5 s duration) by a 30-millisecond burst pacing applied for 0.3 s. (B) AF inducibility rates for ablation (Ab), ablation + spironolactone (AbSpi) and sham groups. AF tended to be more easily induced in the AbSpi group than in sham animals ( $p = 0.07$ ). (C) Long-lasting (>15 min) atrial fibrillation (LLAF) inducibility rates for ablation (Ab), ablation + spironolactone (AbSpi) and sham groups. (D) AF duration. Data described as median and interquartile range. AF duration tended to be increased in the Ab group compared with sham and AbSpi groups ( $p = 0.07$ ). NIAF: noninducible AF; NSAF: non-sustained AF; SAF: sustained AF; \*\* $p = 0.005$  versus sham; NS: non-significant.



**Fig. 2.** Picrosirius stains of the left atrium from 1 animal in each group (top) and comparison of the percentage of collagen density in the left atrium (bottom). Interstitial fibrosis was increased in the ablation (Ab) group as compared to sham animals (\* $p < 0.001$ ) and ablation + spironolactone (AbSpi) group (# $p < 0.01$ ). The amount of fibrosis did not differ between AbSpi and sham rats. Numbers inside bars indicate sample sizes.



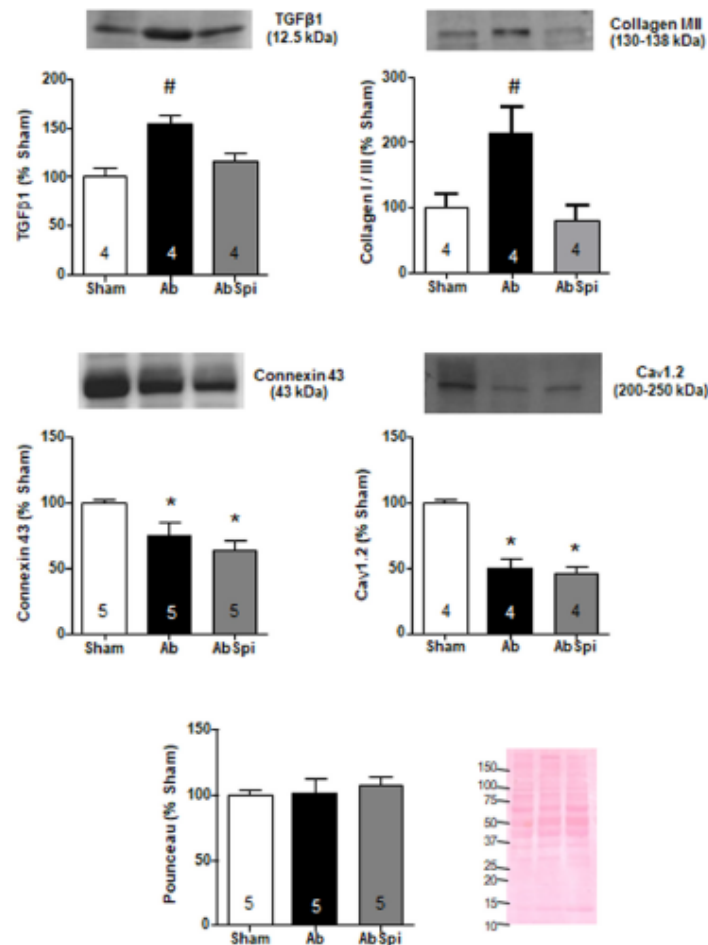


Fig. 3. Left atrial myocytes expression of: transforming growth factor beta 1 (TGFβ1); collagen I/III; connexin 43; Cav1.2 and Ponceau staining as loading control for ablation (Ab), ablation + spironolactone (AbSpi) and sham groups. \* $p < 0.01$  vs. sham; <sup>#</sup> $p < 0.01$  vs. sham and AbSpi groups. Numbers inside bars indicate sample sizes.

low mortality of our model, in the present study, death rate during the first 3 weeks of follow-up did not differ between ablated animals (Ab 16%, AbSpi 28%) and sham controls (17%;  $p = \text{NS}$ ).

In our heart failure model induced by RF ablation, infarct size and the degree of myocardial dysfunction and atrial dilation are highly reproducible. These features derive from the mechanisms of RF lesion formation, which is thermally mediated and can be controlled by adjusting power delivery, application time and electrode size [11,12,21]. In the present study, ablated rats consistently developed mild heart failure and atrial remodeling, characterized by dilation and interstitial fibrosis of the left atrium (Table 1, Fig. 2). In addition, expression of the fibrogenic protein TGFβ1 and collagen I/III was markedly increased in the ablation group while gap junction protein connexin 43 and the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\text{Ca}_v1.2$  were significantly decreased in ablated animals (Fig. 3). It is well recognized in animal models of heart failure that these structural abnormalities increase vulnerability to AF [1–3,22]. Accordingly, AF inducibility (episodes  $\geq 2$  s of duration) was consistently increased (Fig. 1B) in the ablation group compared to sham animals (86% vs. 52%;  $p = 0.005$ ). Further,

sustained ( $>30$  s of duration) and long-lasting AF episodes ( $>15$  min) were more frequently observed in the ablation group than in sham animals (Fig. 1, panels Band C). Of note, our AF inducibility rate (86%) is comparable to rats undergoing coronary occlusion (73%) [16,22].

It has been demonstrated in a rat model that aldosterone induces a substrate for atrial arrhythmias with locally disturbed conduction and characterized by atrial fibrosis and myocyte hypertrophy [23]. Noteworthy, these results were independent of increased atrial load pointing out to a direct proarrhythmic effect of aldosterone. Accordingly, it has been shown in experimental studies that mineralocorticoid receptor blockers mitigate heart failure-induced atrial fibrosis and AF inducibility [3,19,20,22]. In the present investigation, spironolactone significantly reduced atrial interstitial fibrosis as well as TGFβ1 and collagen I/III expression but did not affect connexin 43 and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\text{Ca}_v1.2$  expression (Figs. 2 and 3), suggesting that changes in electrical remodeling represented by reduced  $\text{Ca}_v1.2$  and connexin-43 expression are unchanged by spironolactone treatment. These observations further suggest that our RF ablation model exhibits atrial remodeling characteristics

comparable to those of heart failure induced by coronary occlusion [19,20,22]. Left atrial size was significantly larger in the spironolactone group compared to the ablation group (Table 1). The reasons for this finding are unclear but may be related to drug effects on atrial remodeling. Dilated left atrium is likely derived from left ventricular dysfunction and haemodynamic atrial overload [19]. Unfortunately, atrial pressure was not evaluated in our study.

Although aldosterone significantly reduced structural remodeling (less fibrosis) the AbSp group exhibited almost the same inducibility of AF as the Ab group. This puzzling observation may be connected to persistent changes in the electrophysiological properties of the atrium (electrical remodeling) [2]. Expression of  $Ca_v1.2$  and connexin 43 remained significantly decreased in animals treated with spironolactone. Atrial L-type  $Ca^{2+}$  current is downregulated in heart failure changing action potential configuration and refractoriness [2,6]. In addition, abnormal atrial  $Ca^{2+}$  handling occurs in heart failure [24,25] and other AF models like spontaneously hypertensive rats [26] and contribute to the development of ectopic activity. Accordingly, it is well recognized that AF can be initiated and maintained by rapid focal firing [2,22]. Finally, gap junction remodeling may promote slow local conduction favoring sustained reentry [2,4,5]. It has been consistently reported in animal models [4,5], including a rapid pacing pig model of AF and severe heart failure [27], that alterations in connexin 43 expression are associated with AF.

The increased susceptibility to AF in heart failure is mainly related to conduction abnormalities throughout the atria secondary to interstitial fibrosis [1–3]. Although atrial structural remodeling could be clearly demonstrated in our model, we were unable to determine the electrophysiological mechanisms underlying the increased AF vulnerability. Due to poor catheter stability, atrial refractory periods were not evaluated by extra-stimulus testing. As a result, we have used the AF cycle length recorded in the intracavitary electrodes as an estimate of atrial refractoriness [17,18]. AF intervals were longer in the ablation group than in sham animals, but this difference did not reach significance. Also, conduction velocity was not assessed. It would be interesting to conduct optical mapping studies to address these issues [28]. Nevertheless, AF vulnerability could be consistently demonstrated using a stimulation protocol with burst pacing for up to 30 s. This aggressive protocol could overestimate AF inducibility, but would not affect its sustenance. Furthermore, the definition of AF in our study required an arbitrary duration cut-off of at least 2 s whereas in most studies the duration cut-off ranges from 0.5 to 1.0 s [16,22,28]. Finally, atrioventricular conduction intervals were not recorded, but these variables do not affect AF inducibility.

#### 4.1. Study limitations

This study was conducted in rats thus the results cannot be directly extrapolated to humans. Although AF vulnerability was increased, it is unclear whether spontaneous arrhythmias occur. The criteria used for measuring AF cycle length were arbitrary and subject to selection bias. Infarct size was not assessed, and the degree of left ventricular systolic dysfunction was determined by echocardiography only. Hemodynamic measurements were not performed, but they exhibit good correlations with echocardiography parameters [12]. Of note, our left ventricular ejection fraction figures for ablated and sham animals are comparable to other reports concerning infarcted rats and controls [29–32]. Mild systolic ventricular dysfunction was consistently induced in our model. Interestingly, in patients with mild systolic heart failure, eplerenone reduced the incidence of new onset atrial AF [33]. Because RF lesion formation can be easily controlled in the experimental setting [21], our model has the potential to titrate left ventricle lesion size reproducing several degrees of heart failure. Electrode-tissue contact force is a key factor in RF lesion size. Unfortunately, our custom catheter is not equipped with contact force sensing technology, which could further improve reproducibility of infarct size [34].

## 5. Conclusions

Rats with RF-induced mild heart failure exhibit pronounced atrial structural remodeling and enhanced AF vulnerability. These features reproduce those of heart failure induced by coronary occlusion. The low mortality and high reproducibility of left ventricle myocardial infarction size associated with our model make it attractive for studying AF substrate in heart failure.

## Author contributions

Conceived and designed the experiments: LDS, PT, AADP, GF. Performed the experiments: LDS, ELA, AJS, AY, LS, FAS, GKC, LVR, GF. Analyzed the data: LDS, AJS, GKC, LVR, GF. Wrote the paper: LDS, LVR, GF.

## Conflict of interest

There are no potential conflicts of interests.

## Acknowledgements

This research was supported by grants (2013/23725-0; 2013/23553-5) from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (LDS and GF).

## References

- [1] B.S. Stambler, K.R. Laurita, Atrial fibrillation in heart failure: steady progress but still a long way to go, *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 1 (2008) 77–79, <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.108.785071>.
- [2] S. Nattel, B. Burstein, D. Dobrev, Atrial remodeling and atrial fibrillation: mechanisms and implications, *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 1 (2008) 62–73, <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.107.754564>.
- [3] T.H. Everett 4th, J.E. Olgin, Atrial fibrosis and the mechanisms of atrial fibrillation, *Heart Rhythm* 4 (2007) S34–S77, <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2006.12.040>.
- [4] B. Burstein, P. Contois, G. Michael, K. Nishida, L. Villeneuve, Y.H. Yeh, et al., Changes in connexin expression and the atrial fibrillation substrate in congestive heart failure, *Circ. Res.* 105 (2009) 1213–1222, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.189400>.
- [5] M.M. Jennings, J.K. Donahue, Connexin remodeling contributes to atrial fibrillation, *J. Atrial Fibrillation* 6 (2013) 839, <https://doi.org/10.4022/jafib.839>.
- [6] R.C. Bond, S.M. Bryant, J.J. Watson, J.C. Hancock, C.H. Orchard, A.F. James, Reduced density and altered regulation of rat atrial L-type  $Ca^{2+}$  current in heart failure, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 312 (2017) H384–H391, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00528.2016>.
- [7] C. Lammers, T. Dartsch, M.C. Brandt, D. Rottländer, M. Halbach, G. Peinleifer, et al., Spironolactone prevents aldosterone-induced increased duration of atrial fibrillation in rat, *Cell. Physiol. Biochem.* 29 (2012) 833–840, <https://doi.org/10.1159/000178488>.
- [8] C. Tanaka-Espinoza, S. Varahan, D. Jeyam, Y. Lu, B.S. Stambler, Eplerenone-mediated regression of electrical activation delays and myocardial fibrosis in heart failure, *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 25 (2014) 566–577, <https://doi.org/10.1111/jce.12390>.
- [9] M.A. Pfeffer, J.M. Pfeffer, M.C. Fishbein, P.J. Fletcher, J. Spadaro, R.A. Kloner, et al., Myocardial infarct size and ventricular function in rats, *Circ. Res.* 44 (1979) 503–512, <https://doi.org/10.1161/01.RES.44.4.503>.
- [10] C.F. Opitz, G.F. Mitchell, M.A. Pfeffer, J.M. Pfeffer, Arrhythmias and death after coronary artery occlusion in the rat: continuous telemetric ECG monitoring in conscious, unanesthetized rats, *Circulation* 92 (1995) 253–260, <https://doi.org/10.1161/01.CIR.92.2.253>.
- [11] J.M. Pfeffer, M.A. Pfeffer, E. Braunwald, Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat, *Circ. Res.* 57 (1985) 84–90, <https://doi.org/10.1161/01.RES.57.1.84>.
- [12] E.L. Antonio, A.A. dos Santos, S.R. Araújo, D.S. Bocallini, L. dos Santos, G. Fendon, et al., Left ventricle radio-frequency ablation in the rat: a new model of heart failure due to myocardial infarction homogeneous in size and low in mortality, *J. Card. Fail.* 15 (2009) 540–548, <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2009.01.007>.
- [13] L.F. dos Santos, E. Antonio, A. Serra, G. Venturini, M. Olada, S. Araújo, et al., Radiofrequency ablation does not induce apoptosis in the rat myocardium, *Pacing Clin. Electrophysiol.* 35 (2012) 449–455, <https://doi.org/10.1111/j.1540-8159.2011.03066.x>.
- [14] L.F. dos Santos, E.L. Antonio, A.J. Serra, G. Venturini, J. Montemor, M. Okada, et al., Thermotolerance does not reduce the size or remodeling of radiofrequency lesions in the rat myocardium, *J. Interv. Card. Electrophysiol.* 36 (2013) 5–11, <https://doi.org/10.1007/s10840-012-9746-6>.
- [15] R.M. Kanashiro, R.M. Saralva, A. Alberta, E.L. Antonio, V.A. Moisés, P.J. Tuoci, Immediate functional effects of left ventricular reduction: a Doppler echocardiographic study in the rat, *J. Card. Fail.* 12 (2006) 163–169, <https://doi.org/10.1016/j.jcardfail.2005.08.007>.

- [16] Y. Zhang, E. Dedkov, B. Lee, Y. Li, K. Pun, A.M. Gerdes, Thyroid hormone replacement therapy attenuates atrial remodeling and reduces atrial fibrillation inducibility in a rat myocardial infarction-heart failure model, *J. Card. Fail.* 20 (2014) 1012–1019, <https://doi.org/10.1016/j.jcardfail.2014.10.003>.
- [17] G. Fenelon, B.S. Stambler, E. Hawelle, P. Brugada, W.G. Stevenson, European VENTAK MINI Investigator Group, Left ventricular dysfunction is associated with prolonged average ventricular fibrillation cycle length in patients with implantable cardioverter defibrillators, *J. Interv. Card. Electrophysiol.* 7 (2002) 249–254 <https://doi.org/10.1023/A:102139B525558>.
- [18] H.C. Yuen, S.Y. Roh, D.I. Lee, J. Ahn, D.H. Kim, J. Shim, et al., Atrial fibrillation cycle length as a predictor for the extent of substrate ablation, *Europace* 17 (2015) 1391–1401, <https://doi.org/10.1093/europace/euu330>.
- [19] P. Milliez, N. Desangelis, C. Rucker-Martin, A. Leenhart, E. Vicaut, E. Robidel, et al., Spironolactone reduces fibrosis of dilated atria during heart failure in rats with myocardial infarction, *Eur. Heart J.* 26 (2005) 2193–2199, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehl478>.
- [20] J. Zhao, J. Li, W. Li, Y. Li, H. Shan, Y. Gong, et al., Effects of spironolactone on atrial structural remodeling in a canine model of atrial fibrillation produced by prolonged atrial pacing, *Br. J. Pharmacol.* 159 (2010) 1584–1594, <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00551.x>.
- [21] F.H. Winkamp, H. Nakagawa, RF catheter ablation: lessons on lesions, *Pacing Clin. Electrophysiol.* 29 (2006) 1285–1297, <https://doi.org/10.1111/j.1540-8159.2006.00533.x>.
- [22] K. Nishida, G. Michael, D. Dobrev, S. Nattel, Animal models for atrial fibrillation: clinical insights and scientific opportunities, *Europace* 12 (2010) 160–172, <https://doi.org/10.1093/europace/eup328>.
- [23] J.C. Reil, M. Hohl, S. Selegan, P. Lipp, F. Drautz, A. Kazakow, et al., Aldosterone promotes atrial fibrillation, *Eur. Heart J.* 33 (2012) 2098–2108 <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr266>.
- [24] Y.H. Yeh, R. Waki, X.Y. Qi, D. Chantier, P. Boknik, S. Kaab, et al., Calcium-handling abnormalities underlying atrial arrhythmogenesis and contractile dysfunction in dogs with congestive heart failure, *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 1 (2008) 93–102, <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.107.754788>.
- [25] P. Lugenbuhl, F. Wenz, K. Gotsch, P.A. Schweizer, H.A. Katus, D. Thomas, Atrial fibrillation complicated by heart failure: induces distinct remodeling of calcium cycling proteins, *PLoS One* 10 (2015) e0116396, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116396>.
- [26] F. Huteanu, J. Hell, J. Plackic, Preisenberger J. Nilonova, A. Bukowski, et al., Early subcellular  $Ca^{2+}$  remodeling and increased propensity for  $Ca^{2+}$  alternans in left atrial myocytes from hypertensive rats, *Cardiovasc. Res.* 106 (2015) 87–97, <https://doi.org/10.1093/cvr/cv045>.
- [27] T. Igarashi, J.E. Finet, A. Takeuchi, Y. Fujino, M. Strom, L.D. Greener, et al., Connexin gene transfer preserves conduction velocity and prevents atrial fibrillation, *Circulation* 125 (2012) 216–225, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.053272>.
- [28] Y.K. Iwasaki, T. Kato, F. Xiong, Y.F. Shi, P. Naud, A. Maguy, et al., Atrial fibrillation promotion with long-term repetitive obstructive sleep apnea in a rat model, *J. Am. Coll. Cardiol.* 64 (2014) 2013–2023, <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.05.077>.
- [29] A.B. Stein, S. Tiwari, P. Thomas, G. Hunt, C. Levant, M.F. Stoddard, et al., Effects of anesthesia on echocardiographic assessment of left ventricular structure and function in rats, *Basic Res. Cardiol.* 102 (2007) 28–41 <https://doi.org/10.1007/s00395-006-0627-y>.
- [30] E. Guasch, R. Benito, X. Qi, C. Cifelli, P. Naud, Y. Shi, et al., Atrial fibrillation promotion by endurance exercise: demonstration and mechanistic exploration in an animal model, *J. Am. Coll. Cardiol.* 62 (2013) 68–77, <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.01.091>.
- [31] K.I. Cho, S.H. Koo, T.J. Cha, J.H. Heo, H.S. Kim, G.B. Jo, et al., Simvastatin attenuates the oxidative stress, endothelial thrombogenicity and the inducibility of atrial fibrillation in a rat model of ischemic heart failure, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 14803–14818, <https://doi.org/10.3390/ijms150814803>.
- [32] R.C. Pasqualin, C.T. Mostard, L.E. de Souza, M.F. Vane, R. Simentre, D.A. Otsuki, et al., Sevoflurane preconditioning during myocardial ischemia-reperfusion reduces infarct size and preserves autonomic control of circulation in rats, *Acta Cir. Bras.* 31 (2016) 338–345 <https://doi.org/10.1590/S0102-86582016006000008>.
- [33] K. Swedberg, F. Zannad, J.J. McMurray, H. Krum, D.J. van Veldhuisen, H. Shi, et al., EMPHASIS-HF Study Investigators, Eplerenone and atrial fibrillation in mild systolic heart failure: results from the EMPHASIS-HF (Eplerenone in Mild Patients Hospitalization And Survival Study in Heart Failure) study, *J. Am. Coll. Cardiol.* 59 (2012) 1598–1603, <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.11.063>.
- [34] A. Ikeda, H. Nakagawa, H. Lambert, D.C. Shah, E. Ronck, A. Yulzari, et al., Relationship between catheter contact force and radiofrequency lesion size and incidence of steam pop in the beating canine heart: electrogram amplitude, impedance, and electrode temperature are poor predictors of electrode-tissue contact force and lesion size, *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 7 (2014) 1174–1180, <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.113.001044>.

## Apêndice 2 – Dados brutos do ecocardiograma - Grupo SHAM

GRUPO SHAM											
MODO M											
	ID	P	AO - Modo	AE - Modo	AE/Ao	SVD	PVED	DVED	DVES	Fenc	Fej
		g	cm	cm		cm	cm	cm	cm	%	%
1	83093	460	0,38	0,71	1,87	0,16	0,15	0,80	0,41	49	86
2	83105	360	0,38	0,64	1,68	0,16	0,15	0,77	0,40	48	85
3	82890	426	0,39	0,68	1,74	0,16	0,13	0,70	0,33	53	89
4	82115	377	0,30	0,52	1,73	0,16	0,16	0,58	0,18	69	96
5	83282	430	0,28	0,59	2,11	0,18	0,17	0,72	0,29	60	93
6	80624	453	0,40	0,59	1,48	0,18	0,14	0,69	0,18	74	96
7	81894	400	0,31	0,43	1,39	0,16	0,15	0,53	0,19	64	95
8	82333	477	0,37	0,49	1,32	0,16	0,16	0,66	0,32	52	89
9	80166	337	0,35	0,54	1,54	0,17	0,15	0,60	0,24	60	93
10	80127	346	0,43	0,58	1,35	0,16	0,16	0,70	0,35	50	87
11	81543	421	0,34	0,62	1,82	0,14	0,12	0,75	0,29	61	92
12	83881	433	0,41	0,68	1,66	0,13	0,14	0,88	0,38	57	90
13	81641	419	0,30	0,43	1,43	0,13	0,12	0,83	0,53	36	70
14	82830	555	0,31	0,71	2,29	0,14	0,14	0,79	0,31	61	92
15	82350	453	0,40	0,64	1,60	0,16	0,11	0,75	0,40	47	82
16	643A6C0	422	0,36	0,68	1,89	0,20	0,16	0,53	0,27	49	85
17	6439461	383	0,36	0,63	1,75	0,13	0,13	0,72	0,32	56	79
18	16AD39C	367	0,38	0,53	1,39	0,19	0,18	0,66	0,30	55	89
19	6437107	381	0,40	0,61	1,53	0,17	0,17	0,71	0,43	39	75
20	1D060E0	376	0,39	0,68	1,74	0,17	0,17	0,70	0,33	53	88
21	80166	453	0,40	0,77	1,93	0,17	0,17	0,89	0,62	30	63
22	81641	434	0,40	0,61	1,53	0,18	0,17	0,80	0,48	40	76
23	83875	489	0,41	0,68	1,66	0,19	0,15	0,77	0,44	43	77
24	81864	530	0,36	0,75	2,08	0,19	0,16	0,92	0,57	38	70
25	S/ CHIP	386	0,35	0,64	1,83	0,17	0,16	0,74	0,44	41	77
26	82333	402	0,39	0,66	1,69	0,16	0,13	0,89	0,55	38	74
27	83511	452	0,34	0,62	1,82	0,14	0,11	0,84	0,44	48	83
28	80062	398	0,34	0,76	2,24	0,15	0,15	0,81	0,50	38	73
29	83935	432	0,36	0,69	1,92	0,16	0,15	0,82	0,49	40	76

GRUPO SHAM														
MOD0 BI														
	ID	AE - ML	AE - IS	AE ÁREA 4cam	AO	AE	A Ae Bi	AE/Ao	IM	Dias	Sist	FEAT	CDM	CSM
		cm	cm	cm <sup>2</sup>	cm	cm	cm <sup>2</sup>			cm	cm	%	cm	cm
1	83093	0,59	0,70	0,34	0,37	0,38	0,38	1,03	0	0,47	0,13	72	2,50	1,36
2	83105	0,50	0,54	0,25	0,35	0,44	0,42	1,26	0	0,47	0,10	79	2,40	1,10
3	82890	0,56	0,55	0,30	0,32	0,42	0,40	1,31	0	0,42	0,08	82	2,30	1,02
4	82115	0,46	0,43	0,19	0,35	0,42	0,39	1,20	0	0,23	0,03	87	1,78	0,61
5	83282	0,52	0,60	0,28	0,32	0,41	0,31	1,28	0	0,41	0,09	78	2,33	1,11
6	80624	0,53	0,61	0,28	0,35	0,46	0,41	1,31	0	0,39	0,05	87	2,27	0,86
7	81894	0,48	0,49	0,19	0,34	0,41	0,38	1,21	0	0,22	0,03	86	1,60	0,69
8	82333	0,53	0,59	0,29	0,36	0,40	0,40	1,11	0	0,38	0,10	74	2,24	1,20
9	80166	0,44	0,54	0,18	0,31	0,38	0,29	1,23	0	0,36	0,08	78	2,10	1,05
10	80127	0,53	0,62	0,29	0,32	0,33	0,31	1,03	0	0,39	0,09	77	2,20	1,11
11	81543	0,49	0,56	0,26	0,33	0,43	0,38	1,30	0	0,39	0,09	77	2,20	1,05
12	83881	0,55	0,52	0,28	0,36	0,47	0,48	1,31	0	0,48	0,09	81	2,50	1,16
13	81641	0,52	0,60	0,25	0,37	0,47	0,37	1,27	0	0,37	0,19	49	2,20	1,59
14	82830	0,57	0,71	0,33	0,34	0,52	0,45	1,53	0	0,46	0,06	87	2,40	0,90
15	82350	0,65	0,67	0,37	0,38	0,53	0,48	1,39	0	0,44	0,11	75	2,39	1,23
16	643A6C0	0,54	0,73	0,33	0,34	0,48	0,42	1,41	0	0,28	0,13	54	1,90	1,30
17	6439461	0,66	0,67	0,31	0,32	0,48	0,45	1,50	0	0,32	0,10	69	2,07	1,19
18	16AD39C	0,48	0,63	0,30	0,37	0,37	0,29	1,00	0	0,33	0,04	88	2,08	0,68
19	6437107	0,52	0,50	0,21	0,32	0,38	0,34	1,19	0	0,35	0,13	63	2,21	1,36
20	1D060E0	0,52	0,63	0,30	0,33	0,47	0,42	1,43	0	0,39	0,10	74	2,20	1,20
21	80166	0,54	0,71	0,32	0,44	0,62	0,59	1,41	0	0,56	0,25	55	2,75	1,82
22	81641	0,64	0,71	0,40	0,42	0,37	0,41	0,88	0	0,47	0,16	66	2,40	1,50
23	83875	0,55	0,61	0,28	0,35	0,54	0,46	1,54	0	0,36	0,14	61	2,17	1,39
24	81864	0,61	0,75	0,40	0,41	0,60	0,57	1,46	0	0,71	0,26	63	3,02	1,87
25	S/ CHIP	0,46	0,54	0,27	0,29	0,47	0,44	1,62	0	0,42	0,14	67	2,34	1,39
26	82333	0,43	0,58	0,25	0,41	0,49	0,48	1,20	0	0,53	0,25	53	2,63	1,89
27	83511	0,54	0,59	0,27	0,36	0,44	0,45	1,22	0	0,54	0,20	63	2,65	1,62
28	80062	0,57	0,67	0,37	0,36	0,50	0,54	1,39	0	0,45	0,20	56	2,42	1,75
29	83935	0,51	0,64	0,30	0,32	0,51	0,51	1,59	0	0,44	0,22	50	2,40	1,70

GRUPO SHAM													
DOPPLER (PW)													
	ID	HP	FC	FP	GP	E	A	E/A	TDE	TRIV	E/T	FA	GA
			bpm	m/s	mmHg	m/s	m/s		ms	ms		m/s	mmHg
1	83093	N	273	1,01	4,08	1,10	0,41	2,68	43	20	5,50	1,15	5,20
2	83105	N	247	0,80	2,56	0,99	0,81	1,22	30	23	4,30	1,08	4,67
3	82890	N	254	0,81	2,69	1,17	0,41	2,85	53	30	3,90	1,09	4,75
4	82115	N	269	0,97	3,76	0,92	fusi	fusi	fusi	20	4,60	0,94	3,61
5	83282	N	277	0,93	3,46	0,93	0,58	1,60	47	20	4,65	1,07	4,50
6	80624	N	277	0,98	3,84	0,99	0,47	2,11	43	20	4,95	1,20	5,70
7	81894	N	419	0,83	2,76	1,06	fusi	fusi	fusi	20	5,30	1,18	5,57
8	82333	N	247	0,84	2,89	0,89	0,52	1,71	57	20	4,45	1,10	4,80
9	80166	N	243	0,77	2,43	0,78	0,63	1,24	60	23	3,39	0,98	3,69
10	80127	N	265	0,95	3,60	0,84	0,54	1,56	40	20	4,20	1,19	5,66
11	81543	N	250	0,96	3,69	0,91	0,46	1,98	53	23	3,96	1,33	7,08
12	83881	N	186	0,99	4,00	0,95	0,52	1,83	57	30	3,17	0,96	3,60
13	81641	N	234	0,89	3,17	0,90	0,35	2,57	43	23	3,91	0,93	3,46
14	82830	N	202	0,91	3,31	1,29	0,27	4,78	47	20	6,45	1,17	5,48
15	82350	N	171	1,10	4,84	0,99	0,35	2,83	40	27	3,67	1,07	4,58
16	643A6C0	N	194	0,88	3,10	1,10	0,37	2,97	40	20	5,50	1,07	4,58
17	6439461	N	225	0,98	3,84	1,20	0,34	3,53	37	20	6,00	1,02	4,16
18	16AD39C	N	273	0,75	2,25	1,05	0,48	2,19	47	27	3,89	1,11	4,93
19	6437107	N	257	0,76	2,31	0,65	0,33	1,97	43	27	2,41	0,74	2,19
20	1D060E0	N	231	0,88	3,17	1,12	0,32	3,50	50	17	6,59	1,06	4,49
21	80166	N	225	0,82	2,76	1,13	0,41	2,76	30	23	4,91	1,01	4,08
22	81641	N	188	0,82	2,76	0,89	0,38	2,34	23	33	2,70	0,83	2,82
23	83875	N	198	0,76	2,31	0,89	0,39	2,28	33	33	2,70	0,82	2,76
24	81864	N	200	0,84	2,89	1,03	0,32	3,22	23	20	5,15	0,92	3,46
25	S/ CHIP	N	217	0,71	2,02	1,02	0,27	3,78	20	23	4,43	0,80	2,62
26	82333	N	205	0,62	1,54	1,00	0,33	3,03	27	23	4,35	0,78	2,43
27	83511	N	196	0,87	3,10	0,96	0,24	4,00	30	23	4,17	0,84	2,89
28	80062	N	265	0,81	2,69	1,08	0,41	2,63	23	20	5,40	0,99	3,92
29	83935	N	254	0,88	3,17	1,13	0,33	3,42	20	23	4,91	0,88	3,17





GRUPO ABLAÇÃO																			
MODULO BI																			
	ID	AE - ML	AE - IS	AE ÁREA 4cam	AO	AE	A Ae Bi	AE/Ao	IM	Dias	Sist	FEAT	CDM	CSM	AM	CDA	CSA	AA	C-IM
		cm	cm	cm²	cm	cm	cm²			cm	cm	%	cm	cm	cm	cm	cm	cm	cm
1	80397	0,55	0,80	0,35	0,34	0,41	0,41	1,21	32,92	0,56	0,36	36	2,70	2,20	1,01	2,10	1,79	0,57	0,79
2	82919	0,71	0,78	0,49	0,28	0,61	0,73	2,18	33,57	0,73	0,47	36	3,12	2,50	0,97	2,60	2,75	0,95	0,96
3	83133	0,70	0,83	0,47	0,37	0,57	0,70	1,54	40,59	0,97	0,78	20	3,55	3,10	1,34	3,20	2,70	1,40	1,37
4	81648	0,53	0,75	0,34	0,34	0,47	0,46	1,38	33,40	0,61	0,42	31	2,83	2,30	1,14	2,50	1,75	0,64	0,89
5	83406	0,68	0,68	0,39	0,35	0,68	0,80	1,94	34,38	0,82	0,46	44	3,20	2,50	0,86	3,20	2,59	1,34	1,10
6	80931	0,51	0,62	0,29	0,35	0,48	0,46	1,37	26,90	0,56	0,26	54	2,71	1,87	0,61	3,20	2,40	0,98	0,80
7	81062	0,52	0,67	0,28	0,32	0,40	0,31	1,25	14,55	0,31	0,09	71	2,00	1,14	0,10	2,40	1,70	0,54	0,32
8	80796	0,61	0,61	0,33	0,34	0,51	0,47	1,50	30,00	0,76	0,48	37	3,10	2,50	0,93	2,80	2,30	0,84	0,89
9	83925	0,61	0,66	0,35	0,31	0,52	0,49	1,68	29,84	0,51	0,28	45	2,60	2,09	0,69	2,26	1,76	0,76	0,73
10	83757	0,45	0,56	0,21	0,34	0,47	0,35	1,38	33,66	0,53	0,45	15	2,74	2,40	0,93	2,40	2,00	0,80	0,87
11	80341	0,59	0,63	0,35	0,36	0,53	0,42	1,47	35,90	0,63	0,39	38	2,80	2,30	1,03	2,27	1,80	0,79	0,91
12	81454	0,66	0,65	0,38	0,36	0,63	0,68	1,75	31,76	0,80	0,42	48	3,22	2,36	0,93	2,70	2,00	0,95	0,94
13	82839	0,64	0,76	0,42	0,34	0,51	0,66	1,50	34,25	0,66	0,51	23	2,91	2,62	1,19	2,90	2,20	0,80	1,00
14	81674	0,47	0,54	0,21	0,34	0,50	0,40	1,47	30,34	0,51	0,28	45	2,56	1,95	0,59	2,45	2,02	0,93	0,76
15	82571	0,62	0,73	0,37	0,34	0,52	0,47	1,53	35,74	0,73	0,41	44	3,20	2,20	1,09	2,20	1,70	0,84	0,97
16	82474	0,69	0,80	0,49	0,30	0,64	0,80	2,13	45,83	0,84	0,53	37	3,30	2,74	1,35	2,70	2,15	1,40	1,38
17	81792	0,63	0,74	0,39	0,35	0,45	0,39	1,29	37,26	0,69	0,51	26	3,00	2,50	1,15	2,26	2,00	0,81	0,98
18	83826	0,64	0,79	0,45	0,33	0,64	0,78	1,94	48,73	0,66	0,45	32	2,99	2,50	1,41	2,92	2,40	1,47	1,44
19	82768	0,53	0,52	0,24	0,38	0,50	0,57	1,32	30,54	0,70	0,42	40	3,10	2,36	0,65	2,50	2,00	1,06	0,86
20	80018	0,73	0,85	0,59	0,41	0,71	0,68	1,73	27,37	0,53	0,19	64	2,64	1,59	0,72	2,00	1,19	0,55	0,64
21	80115	0,88	0,83	0,58	0,30	0,64	0,61	2,13	0,00	0,71	0,30	58	3,08	2,01					0,00
22	83105*																		0,00
23	80120	0,53	0,65	0,30	0,31	0,55	0,64	1,77	43,13	0,65	0,53	18	2,91	2,65	1,12	2,40	2,03	1,17	1,15
24	83881	0,51	0,63	0,28	0,33	0,52	0,48	1,58	39,92	0,56	0,30	46	2,76	2,08	1,00	2,35	2,10	1,04	1,02
25	82088	0,54	0,74	0,32	0,33	0,54	0,42	1,64	38,38	0,63	0,33	48	2,89	2,13	1,02	2,53	2,15	1,06	1,04
26	81062	0,41	0,73	0,25	0,35	0,47	0,39	1,34	36,90	0,57	0,33	42	2,75	2,16	0,79	2,21	1,86	1,04	0,92
27	81164	0,50	0,68	0,31	0,31	0,50	0,44	1,61	27,74	0,51	0,18	65	2,58	1,56	0,50	2,07	1,56	0,79	0,65
28	81454	0,53	0,71	0,31	0,34	0,51	0,48	1,50	39,73	0,80	0,47	41	3,24	2,48	0,89	2,70	2,42	1,47	1,18
29	83282	0,65	0,68	0,40	0,36	0,51	0,46	1,42	49,11	0,72	0,58	19	3,12	2,84	1,30	2,48	2,26	1,45	1,38
30	80127	0,57	0,60	0,35	0,35	0,61	0,60	1,74	39,88	0,57	0,32	44	2,74	2,00	0,96	2,25	1,82	1,03	1,00
31	81792	0,61	0,75	0,39	0,31	0,66	0,58	2,13	41,06	0,80	0,49	39	3,20	2,60	1,22	2,67	2,32	1,19	1,21
32	81543	0,58	0,76	0,37	0,33	0,50	0,47	1,52	37,14	0,62	0,30	52	2,87	2,02	0,81	2,38	1,63	1,14	0,98
33	80931	0,59	0,67	0,36	0,33	0,58	0,65	1,76	39,63	0,63	0,45	29	2,87	2,40	1,14	2,00	1,56	0,79	0,97
34	82830	0,60	0,74	0,38	0,37	0,57	0,65	1,54	45,09	0,68	0,50	26	3,08	2,76	1,38	2,42	2,10	1,10	1,24
35	1C33606	0,65	0,68	0,40	0,42	0,77	0,77	1,83	33,51	0,92	0,54	41	3,44	2,68	1,02	2,38	1,82	0,93	0,98
36	674D5D0	0,56	0,62	0,30	0,28	0,55	0,58	1,96	38,36	0,66	0,40	39	2,94	2,30	0,92	2,43	2,06	1,14	1,03
*Abscesso epicárdico																			

GRUPO ABLAÇÃO													
DOPPLER (PW)													
	ID	HP	FC	FP	GP	E	A	E/A	TDE	TRIV	E/T	FA	GA
			bpm	m/s	mmHg	m/s	m/s		ms	ms		m/s	mmHg
1	80397	N	265	0,52	1,08	1,07	0,24	4,46	30	23	4,65	1,00	4,00
2	82919	N	265	0,52	1,08	1,17	0,25	4,68	30	17	6,88	0,77	2,43
3	83133	N	295	0,56	1,30	0,98	0,30	3,27	27	20	4,90	0,76	2,31
4	81648	N	247	0,65	1,74	0,98	0,38	2,58	33	23	4,26	0,84	2,80
5	83406	N	250	0,66	1,80	1,40	0,20	7,00	30	13	10,77	0,99	3,92
6	80931	N	228	0,60	1,44	1,02	0,44	2,32	53	27	3,78	1,06	4,49
7	81062	N	237	0,62	1,54	1,09	0,26	4,19	33	23	4,74	0,93	3,53
8	80796	N	254	0,83	2,76	0,99	0,30	3,30	37	23	4,30	0,77	2,43
9	83925	N	240	0,98	3,80	1,20	0,52	2,31	43	27	4,44	0,98	3,80
10	83757	N	367	0,74	2,19	0,67	0,40	1,68	50	33	2,03	0,67	1,85
11	80341	N	194	0,75	2,20	0,89	0,35	2,54	89	40	2,23	0,91	3,30
12	81454	N	154	0,63	1,59	1,39	0,32	4,34	43	23	6,04	0,84	2,82
13	82839	N	209	0,85	2,96	1,19	0,21	5,67	50	20	5,95	0,90	3,24
14	81674	N	237	1,22	5,90	0,80	0,61	1,31	60	23	3,48	1,25	6,25
15	82571	N	261	0,73	2,19	1,02	0,30	3,40	40	23	4,43	1,03	4,20
16	82474	N	265	0,64	1,69	1,44	0,66	2,18	27	10	14,40	1,20	5,80
17	81792	N	251	0,56	1,65	1,06	0,35	3,03	40	37	2,86	0,87	3,10
18	83826	N	217	1,02	4,08	1,16	0,14	8,29	57	27	4,30	0,96	3,70
19	82768	N	250	0,92	3,46	0,77	0,60	1,28	43	23	3,35	1,15	5,29
20	80018	N	202	0,85	2,96	1,31	0,14	9,36	57	20	6,55	0,93	3,46
21	80115	S	222	0,49	0,96	1,14	0,26	4,38	27	27	4,22	0,97	3,70
22	83105*	N		0,81	2,69	0,88	0,40	2,20	20				
23	80120	N	220	0,81	2,69	0,90	0,30	3,00	20	30	3,00	0,92	3,46
24	83881	N	205	0,86	2,96	0,93	0,40	2,33	33	27	3,44	1,03	4,24
25	82088	N	247	0,78	2,50	1,09	0,33	3,30	33	27	4,04	0,98	3,92
26	81062	N	240	0,89	3,24	1,06	0,48	2,21	27	30	3,53	1,12	5,02
27	81164	N	254	0,68	1,85	1,08	0,45	2,40	20	20	5,40	1,19	5,66
28	81454	N	231	0,86	3,03	1,14	0,48	2,38	23	17	6,71	0,93	3,46
29	83282	N	240	0,86	2,96	1,05	0,53	1,98	27	23	4,57	1,07	4,58
30	80127	N	243	0,89	3,17	0,96	0,45	2,13	33	23	4,17	0,87	3,10
31	81792	N	250	0,74	2,25	0,91	0,38	2,39	23	27	3,37	0,98	3,84
32	81543	N	273	0,77	2,43	0,85	0,38	2,24	23	23	3,70	0,84	2,89
33	80931	N	191	0,91	3,33	0,97	0,28	3,46	33	27	3,59	0,99	4,00
34	82830	N	269	0,79	2,50	0,85	0,45	1,89	20	27	3,15	0,99	3,90
35	1C33606	N	228	0,73	2,19	0,92	0,31	2,97	23	27	3,41	0,85	2,89
36	674D5D0	S	228	0,50	1,00	1,00	0,29	3,45	27	23	4,35	0,92	3,46
*Abscesso epicárdico													

## Apêndice 4 – Dados brutos do ecocardiograma - Grupo Ablação + Espironolactona

GRUPO ABLAÇÃO + ESPIRONOLACTONA											
MODOS M											
	ID	P	AO - Modo	AE - Modo	AE/Ao	SIVD	PVED	DVED	DVES	Fenc	Fej
		g	cm	cm		cm	cm	cm	cm	%	%
1	83925	422	0,33	0,66	2,00	0,17	0,15	0,94	0,72	23	50
2	80018	489	0,40	0,80	2,00	0,15	0,12	1,10	0,82	25	56
3	82350	453	0,34	0,73	2,15	0,16	0,11	0,93	0,69	26	55
4	82474	419	0,31	0,77	2,48	0,16	0,14	1,00	0,76	24	52
5	80731	418	0,36	0,76	2,11	0,14	0,14	0,88	0,69	22	48
6	82839	410	0,36	0,67	1,86	0,15	0,12	0,94	0,72	23	51
7	80624	448	0,38	0,83	2,18	0,15	0,12	0,94	0,73	22	48
8	82571	398	0,36	0,68	1,89	0,15	0,14	0,94	0,72	23	51
9	83093	459,91	0,34	0,75	2,21	0,16	0,13	0,94	0,60	36	71
10	82768	387	0,29	0,69	2,38	0,16	0,10	0,81	0,55	32	64
11	6750C08	477	0,30	0,71	2,37	0,19	0,16	0,96	0,78	19	45
12	12686B4	497	0,33	0,89	2,70	0,12	0,10	0,97	0,77	21	46
13	1C59BF0	408	0,34	0,77	2,26	0,21	0,19	1,09	0,80	27	57
14	674D882	428	0,38	0,83	2,18	0,15	0,12	0,92	0,73	21	46
15	83757-2	474	0,40	0,67	1,68	0,16	0,14	0,97	0,72	26	56
16	83244	396	0,36	0,71	1,97	0,14	0,11	0,99	0,75	24	52
17	80341	382	0,40	0,72	1,80	0,18	0,12	0,89	0,70	21	49
18	82890	424	0,32	0,80	2,50	0,14	0,11	0,96	0,71	26	56
19	82115	405	0,40	0,86	2,15	0,15	0,15	1,04	0,73	30	61
20	80796	408	0,30	0,77	2,57	0,17	0,10	0,97	0,81	16	39

GRUPO ABLAÇÃO + ESPIRONOLACTONA																			
MODOS BI																			
	ID	AE - ML	AE - IS	ÁREA 4cam	AO	AE	A Ae Bi	AE/Ao	IM	Dias	Sist	FEAT	CDM	CSM	AM	CDA	CSA	AA	C-IM
		cm	cm	cm <sup>2</sup>	cm	cm	cm <sup>2</sup>			cm	cm	%	cm	cm	cm	cm	cm	cm	cm
1	83925	0,52	0,57	0,27	0,31	0,50	0,38	1,61	29,03	0,58	0,33	43	2,77	2,15	0,68	2,19	1,74	0,76	0,72
2	80018	0,60	0,76	0,38	0,40	0,61	0,64	1,53	39,07	0,65	0,34	48	2,90	2,20	1,21	2,27	1,75	0,81	1,01
3	82350	0,46	0,64	0,26	0,31	0,43	0,35	1,39	31,96	0,55	0,37	33	2,70	2,20	0,85	2,40	1,87	0,78	0,82
4	82474	0,55	0,71	0,34	0,32	0,55	0,53	1,72	37,58	0,60	0,47	22	2,80	2,53	0,86	2,15	1,70	1,00	0,93
5	80731	0,51	0,75	0,33	0,31	0,51	0,46	1,65	37,12	0,64	0,36	44	2,89	2,20	0,89	2,31	1,72	1,04	0,97
6	82839	0,52	0,68	0,32	0,31	0,56	0,50	1,81	39,01	0,66	0,44	33	2,95	2,46	1,21	2,28	1,89	0,83	1,02
7	80624	0,55	0,78	0,36	0,37	0,59	0,55	1,59	41,83	0,66	0,42	36	2,96	2,46	1,27	2,06	1,53	0,83	1,05
8	82571	0,59	0,77	0,30	0,36	0,50	0,48	1,39	36,79	0,47	0,27	43	2,52	1,94	0,86	1,91	1,36	0,77	0,82
9	83093	0,54	0,73	0,35	0,31	0,53	0,45	1,71	29,30	0,52	0,19	63	2,58	1,59	0,57	2,30	1,78	0,86	0,72
10	82768	0,55	0,63	0,28	0,34	0,46	0,42	1,35	37,83	0,59	0,36	39	2,76	2,17	0,81	2,13	1,71	1,04	0,93
11	6750C08	0,70	0,73	0,42	0,30	0,50	0,45	1,67	35,48	0,61	0,36	41	2,87	2,23	0,90	2,26	1,94	0,92	0,91
12	12686B4	0,76	0,85	0,55	0,39	0,76	0,98	1,95	42,52	0,74	0,51	31	3,10	2,65	1,15	2,78	2,40	1,35	1,25
13	1C59BF0	0,76	0,79	0,50	0,32	0,68	0,80	2,13	42,48	0,87	0,50	43	3,30	2,60	1,11	3,08	2,70	1,60	1,36
14	674D882	0,63	0,76	0,38	0,32	0,61	0,67	1,91	46,62	0,73	0,53	27	3,14	2,60	1,15	2,18	1,90	1,33	1,24
15	83757-2	0,61	0,72	0,42	0,30	0,57	0,52	1,90	37,45	0,67	0,46	31	2,96	2,47	1,10	2,38	1,74	0,90	1,00
16	83244	0,67	0,70	0,41	0,33	0,54	0,49	1,64	39,07	0,68	0,50	26	3,00	2,62	1,14	2,40	1,84	0,97	1,06
17	80341	0,66	0,83	0,46	0,34	0,63	0,73	1,85	39,22	0,62	0,41	34	2,86	2,35	1,12	2,24	1,87	0,88	1,00
18	82890	0,77	0,73	0,46	0,34	0,68	0,70	2,00	43,57	0,70	0,44	37	3,01	2,44	1,06	2,43	2,20	1,31	1,19
19	82115	0,66	0,82	0,47	0,40	0,83	1,08	2,08	49,75	0,82	0,48	41	3,25	2,57	1,42	2,80	2,50	1,59	1,51
20	80796	0,60	0,68	0,39	0,37	0,61	0,63	1,65	40,50	0,80	0,52	35	3,20	2,64	1,05	2,43	2,07	1,23	1,14

GRUPO ABLAÇÃO + ESPIRONOLACTONA													
DOPPLER (PW)													
	ID	HP	FC	FP	GP	E	A	E/A	TDE	TRIV	E/T	FA	GA
			bpm	m/s	mmHg	m/s	m/s		ms	ms		m/s	mmHg
1	83925	N	295	0,88	3,17	0,81	0,60	1,35	20	23	3,52	1,03	4,24
2	80018	N	273	0,93	3,46	1,04	0,37	2,81	27	23	4,52	0,78	2,50
3	82350	N	286	0,91	3,30	0,80	0,49	1,63	30	30	2,67	1,01	4,08
4	82474	N	270	0,73	2,13	1,11	0,43	2,58	37	20	5,55	1,14	5,20
5	80731	N	261	0,83	2,82	1,17	0,46	2,54	27	17	6,88	0,98	3,90
6	82839	N	247	0,76	2,31	1,20	0,40	3,00	23	13	9,23	0,98	3,92
7	80624	N	250	0,86	2,96	1,03	0,43	2,40	30	17	6,06	1,09	4,75
8	82571	N	290	0,69	1,96	1,01	0,52	1,94	27	17	5,94	1,15	5,29
9	83093	N	247	0,82	2,76	1,14	0,41	2,78	27	27	4,22	1,08	4,37
10	82768	N	228	0,81	3,69	0,92	0,39	2,36	23	33	2,79	0,74	2,19
11	6750C08	N	240	0,94	3,53	1,23	0,50	2,46	27	17	7,24	1,11	4,93
12	12686B4	S	225	0,42	0,70	1,17	0,20	5,85	23	17	6,88	0,92	3,46
13	1C59BF0	S	220	0,59	1,44	1,30	0,24	5,42	30	20	6,50	1,08	4,60
14	674D882	S	243	0,48	0,92	1,18	0,22	5,36	20	20	5,90	0,88	3,17
15	83757-2	N	202	0,96	3,76	1,05	0,34	3,09	30	23	4,57	1,01	4,08
16	83244	N	250	0,69	1,96	1,07	0,22	4,86	27	27	3,96	0,98	3,84
17	80341	N	191	0,62	1,54	1,13	0,19	5,95	30	17	6,65	0,98	3,84
18	82890	S	237	0,52	1,08	1,24	0,19	6,53	17	13	9,54	1,00	4,00
19	82115	S	217	0,55	1,21	1,24	0,20	6,20	20	10	12,40	0,96	3,69
20	80796	N	220	0,66	1,74	1,14	0,30	3,80	20	23	4,96	0,88	3,17

## Apêndice 5 – Inducibilidade de FA

SHAM		
	ID	AF (s)
1	83093	230
2	83105	540
3	82890	500
4	82115	0
5	83282	0
6	80624	668
7	81894	0
8	82333	0
9	80166	7
10	80127	543
11	81543	6
12	83881	5
13	81641	0
14	82830	975
15	82350	8
16	643A6C0	0
17	6439461	0
18	16AD39C	0
19	6437107	0
20	1D060E0	0
21	80166	0
22	81641	508
23	83875	0
24	81864	3
25	S/ CHIP	0
26	82333	0
27	83511	3
28	80062	5
29	83935	31

GRUPO ABLAÇÃO		
	ID	FA (s)
1	80397	0
2	82919	5
3	83133	687
4	81648	1140
5	83406	769
6	80931	253
7	81062	5
8	80796	1206
9	83925	1250
10	83757	324
11	80341	960
12	81454	8
13	82839	0
14	81674	1080
15	82571	0
16	82474	229
17	81792	7
18	83826	20
19	82768	338
20	80018	1358
21	80115	1273
22	83105*	11
23	80120	4
24	83881	5
25	82088	5,5
26	81062	1440
27	81164	9
28	81454	1320
29	83282	300
30	80127	1260
31	81792	280
32	81543	18
33	80931	1510
34	82830	1080
35	1C33606	0
36	674D5D0	0

GRUPO ABLAÇÃO + ESPIRONOLACTONA		
	ID	FA (s)
1	83925	1020
2	80018	1200
3	82350	1250
4	82474	720
5	80731	3
6	82839	5,5
7	80624	1170
8	82571	5
9	83093	11
10	82768	484
11	6750C08	0
12	12686B4	0
13	1C59BF0	3,5
14	674D882	0
15	83757-2	294
16	83244	5
17	80341	3
18	82890	0
19	82115	3,5
20	80796	21

Grupo	Não induz FA	FA não sustentada	FA sustentada	FA Longa duração	Total (n)
SHAM	14 (48%)	7 (24%)	8 (27%)	1 (3,4%)	29
Ablação	5 (14%)	11 (30,5%)	20 (55%)	12 (33%)	36
Ablação + espironolactona	4 (20%)	9 (45%)	7 (35%)	4 (20%)	20

## Apêndice 6 – Comprimento do ciclo de FA – AFCL (ms)

[illegible][illegible][illegible]